

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE POTENTIEL DE LA CÉRULOPLASMINÉ  
DANS LE DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU

THÈSE PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR  
PHILIPPE DUCHARME

SEPTEMBRE 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*Une recherche en santé,  
c'est une recherche qui apporte des réponses  
et qui suscite aussi de nombreuses questions.*

*À tous ceux qui m'ont encouragé et soutenu...*

## REMERCIEMENTS

L'accomplissement d'un grand projet comme celui-ci ne se fait pas seul. Des personnes clés m'y ont accompagné et il est important pour moi de les remercier. En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de recherche, Dre Joanne Paquin, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et permis d'entreprendre mon doctorat en biochimie. Au cours des années, Dre Paquin a su créer un environnement académique propice à mon développement scientifique. Sa rigueur scientifique, sa persévérance et son écoute sont des valeurs que Dre Paquin m'a inculquées. Merci Mme Paquin de m'avoir fait confiance, d'avoir investi temps et énergie dans ma formation et de m'avoir constamment soutenu et ce, tant dans les hauts que dans les bas de la recherche. L'aboutissement de ce long travail est le fruit de nombreuses discussions et réflexions scientifiques que j'ai eues avec vous. Merci pour vos conseils et vos suggestions, de même que pour votre encadrement tout au long de la rédaction de cette thèse ainsi que pour la révision des articles scientifiques. Durant près de 8 ans, vous avez été le pilier central de ma formation professionnelle et avez contribué à faire de moi un meilleur scientifique.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Mircea-Alexandru Mateescu (UQAM) pour sa précieuse collaboration au projet, particulièrement pour son expertise sur les protéines à cuivre et les matrices chromatographiques. Je remercie également le Dr Samuel David (Centre de recherche en neuroscience, Université McGill) pour nous avoir gracieusement fourni des souris déficientes en céruloplasmine. Enfin, je remercie M. Alain Viau qui a généreusement donné de son temps pour m'accompagner à quelques reprises à l'abattoir de bœufs pour y récupérer du matériel biologique.

Je ne peux passer sous silence la précieuse contribution de mes collègues étudiants du laboratoire que j'ai cotoyés au cours de mes études. C'est avec bonheur et privilège que j'ai travaillé avec Frédéric Bouchard, un collègue hors pair qui avec les années est devenu un grand ami. Merci Frédéric pour tous nos échanges scientifiques, tes conseils, ta complicité et ton soutien. Ce fut pour moi un réel plaisir de travailler avec toi durant toutes ces années. Je remercie tout particulièrement Houda Salmi pour sa contribution significative dans mon projet. Merci également à Josianne Gagné, Mylène Paradis et Nathalie St-Pierre, de même



que les Drs Marc Lemieux et Hugo Lachance. Vous avez tous contribué à votre façon à mon épanouissement professionnel et personnel.

La famille occupe une place importante pour moi. Ainsi je veux remercier mes parents, Marie Turmel et Louis Ducharme, ma sœur Amélie et mon frère Julien, qui m'ont encouragé à toujours persévérer dans les projets que j'entreprends. J'exprime aussi ma profonde reconnaissance envers Annie Gosselin qui su constamment être là pour me soutenir. Un merci va également à un grand ami, Louis-Éric Trudeau, pour ses bons conseils et son écoute.

Je remercie le Centre de Recherche Biomed de l'UQAM pour le prix qui m'a été octroyé lors du colloque annuel Biomed 2009. Merci également à la Fondation de l'UQAM ainsi que la Faculté des Sciences de l'UQAM pour leur soutien financier.

En terminant, je remercie le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) du Canada pour le subventionnement du projet sans lequel les travaux de cette thèse n'auraient pu être réalisés.

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
LISTE DES FIGURES .....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
RÉSUMÉ .....	xviii
INTRODUCTION .....	1
PARTIE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	4
CHAPITRE I	
LA CÉRULOPLASMINE .....	5
1.1 Généralités .....	5
1.2 Découverte de la CP.....	5
1.3 Caractéristiques structurales de la CP .....	6
1.4 Biosynthèse et expression de la CP.....	10
1.5 Principaux rôles associés à la CP .....	14
1.5.1 Activité catalytique de la CP.....	15
1.5.2 Régulateur des amines biogènes .....	16
1.5.3 Transport du cuivre .....	16
1.5.4 Propriétés antioxydantes .....	19
1.5.5 Protéine de phase aiguë.....	21
1.5.6 Rôle dans l'angiogenèse.....	21
1.5.7 Régulateur du métabolisme du fer .....	22
1.5.8 Autres actions de la CP .....	28
1.5.9 L'héphaestine, protéine homologue de la CP .....	29
1.6 Protéines de liaison de la CP.....	30
1.7 Profil ontogénique de l'expression de la CP .....	37
1.8 CP et désordres du cerveau .....	38
1.8.1 CP et maladies neurodéveloppementales .....	38
1.8.2 CP et maladies neurodégénératives.....	39

1.8.3 Autres maladies reliées à la CP et ayant un impact sur la santé neurologique.....	41
1.8.4 Modèle animal déficient en CP et ses caractéristiques.....	42
CHAPITRE II	
DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU ET NEUROMIGRATION .....	44
2.1 Premières étapes du développement de l'embryon.....	44
2.2 Description phénoménologique de la neurulation.....	46
2.3 Spécification neuronale et prolifération cellulaire .....	47
2.4 La corticogénèse : la grande migration neuronale .....	49
2.5 La formation des grandes régions du cerveau et leurs principales fonctions.....	54
2.6 La synaptogénèse et la myélinisation.....	56
2.7 La survie des neurones et l'apoptose .....	58
2.8 Les principaux neurotransmetteurs du SNC .....	59
CHAPITRE III	
RÉGULATEURS DE LA NEUROMIGRATION.....	64
3.1 La reeline .....	64
3.1.1 Structure de la reeline.....	64
3.1.2 Rôles associés à la reeline .....	65
3.1.3 Mécanismes d'action de la reeline .....	69
3.1.4 Profil d'expression développemental de la reeline.....	76
3.1.5 Reeline et désordres neurologiques.....	81
3.2 Autres protéases dans la migration neuronale.....	83
3.3 Le système AMPc/PKA .....	84
3.4 Les protéine-kinases activées par des mitogènes (MAPK).....	87
3.4.1 La famille des MAPK ERK .....	88
CHAPITRE IV	
LE MODÈLE DE CARCINOME EMBRYONNAIRE MURIN P19 .....	91
4.1 Origine du modèle et différenciation neuronale.....	91
4.2 Action neuroagréative de la CP .....	95

PARTIE II	
PARTIE EXPÉRIMENTALE .....	97
CHAPITRE V	
PROJET DE RECHERCHE .....	98
5.1 Problématique .....	98
5.2 Hypothèse de travail .....	99
5.3 Objectifs de recherche.....	100
5.4 Approche expérimentale .....	100
5.4.1 Purification de la CP à partir de sang de bœuf .....	100
5.4.2 Culture, différenciation et traitement des cellules P19.....	101
5.4.3 Stratégies pour étudier les relations possibles entre l'action neuroagrégate de la CP et la reeline ou d'autres protéases à sérine <i>in vitro</i> .....	103
5.4.4 Stratégies pour étudier les relations possibles entre la CP et la reeline <i>in vivo</i> ..	104
5.4.5 Stratégies pour étudier les mécanismes cellulaires de l'action agrégative de la CP sur les neurones P19 .....	107
5.5 Contributions à la recherche .....	108
CHAPITRE VI	
L'AGRÉGATION DES NEURONES P19 INDUITE PAR LA CÉRULOPLASMINE IMPLIQUE UNE ACTIVITÉ DE PROTÉASE À SÉRINE ET EST ACCOMPAGNÉE PAR UN CLIVAGE DE LA REELINE .....	109
6.1 Résumé.....	111
6.2 Abstract.....	113
6.3 Introduction.....	114
6.4 Experimental procedures.....	116
6.4.1 CP preparation.....	116
6.4.2 Cell culture, differentiation and treatment .....	116
6.4.3 Neuronal aggregation evaluation .....	117
6.4.4 Total protein extraction .....	117
6.4.5 Western blotting.....	118
6.4.6 Chromogenic casein assay of protease .....	118
6.4.7 Statistics .....	119
6.5 Results.....	119
6.5.1 Effect of SBTI and Apro on CP-induced neuronal aggregation.....	119

6.5.2 CP and reelin protein profiles in neuronal aggregation.....	120
6.5.3 CP neuroaggregative action does not depend on the generation of 300K reelin and reelin function.....	122
6.6 Discussion.....	123
6.7 Acknowledgments.....	127
6.8 Figures.....	128
CHAPITRE VII	
L'EXPRESSION DE LA REELINE 300K ET DE LA PHOSPHO-COFILEINE EST RÉDUITE DANS LE CERVEAU EN DÉVELOPPEMENT DE SOURIS DÉFICIENTES EN CP .....	
7.1 Résumé.....	135
7.2 Abstract.....	137
7.3 Introduction.....	138
7.4 Experimental procedures.....	140
7.4.1 Animals and brain samplings .....	140
7.4.2 Genotyping.....	141
7.4.3 Brain extracts .....	141
7.4.4 Cofilin phosphorylation in P19-derived neurons treated with CP.....	142
7.4.5 Western blotting.....	143
7.4.6 Statistics .....	144
7.5 Results.....	144
7.5.1 Genotype and phenotype analysis of CP-deficient mice.....	144
7.5.2 Expression profile of CP protein during brain development.....	144
7.5.3 Developmental profile of reelin protein species in wild type mouse brains .....	146
7.5.4 Strong reduction of 300K reelin expression in embryonic CP <sup>-/-</sup> mouse brains	146
7.5.5 Reduction of cofilin phosphorylation in embryonic CP <sup>-/-</sup> mouse brains .....	147
7.5.6 CP stimulates cofilin phosphorylation in nascent P19 neurons .....	148
7.6 Discussion.....	148
7.7 Acknowledgments.....	152
7.8 Figures.....	153

## CHAPITRE VIII

LES ACTIONS NEUROTROPHIQUES SUIVANTES DE LA CP, - INDUCTION D'UNE AGRÉGATION CELLULAIRE ET STIMULATION DU CLIVAGE DE LA REELINE -, RÉPONDENT DIFFÉREMMENT À DES MODULATEURS DES VOIES SIGNALISATRICES AMPc/PKA ET ERK1/2.....	159
8.1 Résumé.....	160
8.2 Abstract.....	163
8.3 Introduction.....	164
8.4 Experimental procedures.....	166
8.4.1 CP preparation.....	166
8.4.2 Cell culture, differentiation and treatment .....	166
8.4.3 Evaluation of neuronal aggregation .....	167
8.4.5 Western blotting .....	168
8.4.6 Statistics .....	169
8.5 Results.....	169
8.5.1 CP-induced neuroaggregation, but not reelin processing, is inhibited by activation of cAMP/PKA signalings .....	169
8.5.2 Generation of 300K reelin requires longer exposure to CP than does neuroaggregation .....	171
8.5.3 CP rapidly stimulates ERK1/2 phosphorylation, an action that is not abolished by cAMP .....	172
8.5.4 Inhibition of ERK1/2 signaling affects CP-stimulated generation of 300K reelin, an effect amplified by cAMP .....	172
8.6 Discussion.....	173
8.7 Acknowledgments.....	178
8.8 Figures.....	179

PARTIE III	
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	187
CHAPITRE IX	
DISCUSSION .....	188
9.1 Généralités .....	188
9.2 Implication d'une activité protéolytique dans les actions neuronales de la CP .....	190
9.3 Relation entre la CP et la reeline.....	198
9.3.1 Aspects histologiques.....	198
9.3.2 Fragments de la reeline .....	200
9.3.3 Désordres neurologiques .....	201
9.4 Mécanisme des actions neuronales de la CP.....	205
9.4.1 Modulation par les voies AMPc/PKA et ERK1/2.....	206
9.4.2 Implication des ions de cuivre de la CP .....	208
9.4.3 Implication de récepteurs potentiels de la CP sur les neurones .....	209
9.4.4 Cibles distales de l'action de la CP .....	209
9.5 Le modèle P19, ses limites et d'autres modèles cellulaires pertinents.....	211
9.6 Conclusion .....	213
ANNEXE A	
VIDÉO DE LA CINÉTIQUE DE LA NEUROAGRÉGATION INDUITE PAR LA CP.....	216
ANNEXE B	
COURBES DE CROISSANCE DU POIDS DES SOURIS GESTANTES .....	217
ANNEXE C	
ÉTUDE SUR LE CLIVAGE DE LA REELINE DANS LES MILIEUX CONDITIONNÉS PAR LES NEURONES P19 .....	219
ANNEXE D	
ANALYSE DE L'EFFET DE L'INHIBITEUR GM6001 SUR L'EXPRESSION DE LA REELINE.....	221
ANNEXE E	
ÉTUDE DE LOCALISATION DE LA CP ET LA REELINE PAR IMMUNOFLOUORESCENCE DANS LES CULTURES DE NEURONES P19 .....	223
ANNEXE F	
AUTRE CONTRIBUTION .....	225
BIBLIOGRAPHIE .....	226



## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Représentation tridimensionnelle de la CP humaine .....	8
1.2 Représentation schématique de la structure de la CP.....	9
1.3 Comparaison des séquences C-terminales de la CP sécrétée et la CP-GPI .....	13
1.4 Diminution de la réaction de Fenton par l'action de la CP .....	20
1.5 Rôle de la CP dans le métabolisme du fer dans le SNC .....	25
1.6 Représentation du mécanisme d'entrée du fer indépendant de la Tf pour la levure et les cellules de mammifères .....	27
2.1 Formation du tube neural .....	47
2.2 Représentation schématique de la migration neuronale.....	50
2.3 Élaboration des couches de neurones dans le cortex .....	52
2.4 Représentation des grandes structures du cerveau .....	55
3.1 Structure, fragments et domaines fonctionnels de la reeline.....	66
3.2 Schéma de l'organisation des couches neuronales du cortex.....	68
3.3 Les voies de signalisation de la reeline.....	70
4.1 Le modèle cellulaire P19 .....	93
4.2 Micrographies de cellules P19 .....	95
4.3 Agrégation des neurones P19 induite par la CP.....	96
5.1 Protocole de différenciation neuronale des cellules P19.....	102
6.1 A serine protease activity is involved in the neuroaggregative action of CP .....	128
6.2 CP is not targeted by the proteolytic activity .....	129
6.3 Reelin is produced in P19 cell model and its profile modified in CP-induced neuroaggregation .....	130
6.4 Time course of reelin, ApoER2, VLDLR and Dab1 protein expression, and of neuroaggregation .....	131
6.5 Neuroaggregation and the generation of 300K reelin induced by CP are not inhibited by the CR50 reelin function blocking antibody.....	132
6.6 Possible relationships between CP-induced neuroaggregation and reelin cleavage .....	133
7.1 Confirmation of the CP <sup>-/-</sup> phenotype .....	153
7.2 Developmental protein profile of CP .....	154



7.3 Developmental protein profile of reelin in wild type and CP <sup>-/-</sup> mice .....	155
7.4 Direct comparaisn of reelin levels between wild type and CP <sup>-/-</sup> embryonic brains. ....	156
7.5 Developmental protein profile of p-cofilin in wild type and CP <sup>-/-</sup> mice.....	157
7.6 Time course of cofilin phosphorylation during treatment of P19 neurons with CP.....	158
8.1 Possible relationships between CP-induced neuroaggregation and reelin cleavage. ....	179
8.2 The neuroaggregative action of CP is inhibited by activation of cAMP/PKA signaling.	180
8.3 PKA inhibitor H89 duplicates the neuroaggregative action of CP. ....	181
8.4 Removal of CP after 8 h compromises the generation of 300K reelin but not neuroaggregation. ....	182
8.5 Time course of ERK1/2 phosphorylation during treatment of neurons with CP and cAMP.....	183
8.6 Neuronal effects of the early addition of inhibitors of ERK1/2 signalings.....	184
8.7 Neuronal effects of the late addition of inhibitors of ERK1/2 signalings.....	185
8.8 A new model relates the neurotrophic actions of CP and their modulation by cAMP and ERK1/2 signalings.....	186
A.1 Vidéo « Time Lapse » de la neuroagrégation induite par la CP .....	216
A.2 Courbes de croissance du poids des souris gestantes.....	218
A.3 Étude sur le clivage de la reeline dans les milieux conditionnés par les neurones P19.	220
A.4 Analyse de l'effet de l'inhibiteur GM6001 sur l'expression de la reeline. ....	222
A.5 Étude par immunofluorescence portant au niveau des localisations de la CP et de la reeline dans les cultures de neurones P19.....	224

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Résumé d'études de liaison pour la CP .....	35
1.2 Résumé d'études de caractérisation structurale de protéines de liaison pour la CP .....	36
3.1 Expression de la reeline dans l'ontogénèse du cerveau de mammifères.....	79
5.1 Correspondance des grandes étapes du développement du cerveau avec l'âge des souris .....	106
9.1 Variation de l'expression de la reeline et de la CP dans des désordres neurologiques associés au neurodéveloppement.....	202

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AE-agarose	aminoéthyl-agarose
AMPA	acide $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionique
AMPc	adénosine-3',5'-monophosphate cyclique (cAMP : <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
Apo <sup>CP</sup>	apocéruloplasmine (céruloplasmine dépourvue des atomes de cuivre)
ApoER2	récepteur de l'apolipoprotéine E de type 2 ( <i>apolipoprotein E receptor 2</i> )
Apro	aprotinine ( <i>aprotinin</i> )
AR	acide rétinoïque (RA : <i>retinoic acid</i> )
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
BAEE	N-benzoyl-L-arginine-éthyl-ester
BDNF	facteur neurotrophique dérivé du cerveau ( <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )
BFGF	facteur de croissance fibroblastique basique ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BMP	protéine morphogénique de l'os ( <i>bone morphogenic protein</i> )
CAM	molécule d'adhésion cellulaire ( <i>cellular adhesion molecule</i> )
CP	céruloplasmine ( <i>ceruloplasmin</i> )
CP-DIG	céruloplasmine covalamment marquée à la digoxigénine
CREB	protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPc ( <i>cAMP response element binding protein</i> )
C-t	terminaison-C
Cu <sup>+</sup>	ion cuivreux
Cu <sup>2+</sup>	ion cuivrique
Dab-1	<i>Disabled-1</i>
DBS	sérum de bovin donneur ( <i>donor bovine serum</i> )
DLT	dépression à long terme
DMSO	diméthylsulfoxyde
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique ( <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> )
EGF	facteur de croissance épidermal ( <i>epidermal growth factor</i> )

EPAC	protéine d'échange directement activée par l'AMPc ( <i>exchange protein directly activated by cAMP</i> )
ERK	kinases régulées par des signaux extracellulaires ( <i>extracellular signal-regulated kinases</i> )
ERO	espèces réactives oxygénées
FBS	sérum fœtal bovin ( <i>fetal bovine serum</i> )
Fe <sup>2+</sup> ou Fe (II)	ion ferreux
Fe <sup>3+</sup> ou Fe (III)	ion ferrique
FGF-2	facteur de croissance fibroblastique-2 ( <i>fibroblast growth factor-2</i> )
Fpn	ferroportine
GAP-43	protéine associée à la croissance-43 ( <i>growth associated protein-43</i> )
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GSK3β	glycogène-synthase-kinase-3 beta
HepG2	lignée cellulaire d'hépatoblastome humain
HIS	hybridation <i>in situ</i>
HRE	éléments de réponse à l'hypoxie ( <i>hypoxia-responsive elements</i> )
IGF-1	facteur de croissance similaire à l'insuline-1 ( <i>insulin-like growth factor-1</i> )
IH	immunohistochimie
IL-1	interleukine-1
IP	immunoprécipitation
KPi	tampon phosphate de potassium
LIMK	LIM-kinase ( <i>LIM kinase</i> )
MAP-2	protéine associée aux microtubules-2 ( <i>microtubule associated protein-2</i> )
MAPK	protéine-kinase activée par des mitogènes ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MAP2K	MAPK-kinase
MAP3K	MAPK-kinase-kinase
MEM	médium essentiel d'Eagle modifié ( <i>modified Eagle Essential Medium</i> )
mGluR2	récepteur métabotropique glutamique de type 2
MMP	métalloprotéinases de la matrice
N-CAM	molécule d'adhésion cellulaire neuronale ( <i>neural cell adhesion molecule</i> )
NGF	facteur de croissance des nerfs ( <i>nerve growth factor</i> )

NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NPxY	domaine non-phosphorylable contenant un résidu de tyrosine ( <i>non-phosphorylable domain containing tyrosine residu</i> )
N-t	terminaison-N
$\cdot O_2^-$	radical superoxyde
$\cdot OH^-$	radical hydroxyle
PACAP	polypeptide activateur de l'adénylyl cyclase hypophysaire ( <i>pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide</i> )
PBS	tampon phosphate salin ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PC	plaque corticale
p-cofilin	phospho-cofiline ( <i>phospho-cofilin</i> )
pI	point isoélectrique
PKA	protéine-kinase A ( <i>protein kinase A</i> )
PKG	protéine-kinase G ( <i>protein kinase G</i> )
PLT	potentialisation à long terme
pPD	para-phénylènediamine
PPI	inhibition par préstimulus ( <i>prepulse inhibition</i> )
PTB	domaine de liaison à une tyrosine phosphorylée ( <i>phosphotyrosine binding domain</i> )
PVDF	polyvinylidène difluoré
PW	semaine post-natale ( <i>postnatal week</i> )
qPCR	réaction de polymérase en chaîne quantitative ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
RT	rétrotranscription ( <i>reverse transcription</i> )
SBTI	inhibiteur de trypsine de la fève de soya ( <i>soybean trypsin inhibitor</i> )
SDS	dodécylsulfate de sodium ( <i>sodium-dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
sem	semaine
Ser ou S	acide aminé sérine
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SNC	système nerveux central (CNS : <i>central nervous system</i> )

SNP	système nerveux périphérique
SOD	superoxyde-dismutase
TBS	tampon Tris-salin
Tf	transferrine
Thr ou T	acide aminé thréonine
TNF- $\alpha$	facteur de nécrose tumoral alpha ( <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
tPA	activateur tissulaire du plasminogène ( <i>tissue-type plasminogen activator</i> )
Tyr ou Y	acide aminé tyrosine
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VLDLr	récepteur de lipoprotéines de très faible densité ( <i>very low density lipoprotein receptor</i> )
wt	type sauvage ( <i>wild-type</i> )
ZL	zone laminaire
ZM	zone marginale
ZV	zone ventriculaire

## RÉSUMÉ

Le fonctionnement du cerveau nécessite une organisation finement régulée des neurones. Cette organisation s'établit durant le développement et dépend de mécanismes tels que la neurogenèse, la neuromigration et la synaptogenèse. Ces mécanismes mettent à contribution plusieurs molécules, dont des facteurs de croissance, des protéases, des molécules d'adhésion cellulaire et de guidage ainsi que des composantes de la matrice extracellulaire. Une défaillance de ces mécanismes peut entraîner le développement de désordres neurologiques tels que la schizophrénie, l'épilepsie et le retard mental. La céruloplasmine (CP) pourrait être comptée parmi les molécules susceptibles de contribuer au développement du cerveau.

La CP, une protéine à cuivre de 132 kDa (K), possède une activité ferroxidasique qui en fait un régulateur majeur du métabolisme du fer dans l'organisme. Elle est sécrétée dans la circulation par le foie. On la retrouve aussi dans le cerveau, sous une forme ancrée à la surface de cellules gliales par un groupement glycosylphosphatidylinositol. Des travaux publiés par les équipes des Drs Paquin et Mateescu ont montré que la CP peut induire l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires murines P19. Cette nouvelle action de la CP soulève l'hypothèse d'un rôle de cette protéine dans le développement du système nerveux, possiblement dans l'organisation spatiale des neurones. Les objectifs de cette thèse étaient d'investiguer les mécanismes de l'action agrégative de la CP sur les neurones P19 et une pertinence physiologique de la CP dans le développement.

Pour guider notre travail, nous avons envisagé que la neuroagrégation pouvait avoir des mécanismes communs avec la migration neuronale qui se produit lors du développement et nous avons ainsi considéré deux types de protéines ayant un rôle dans ce processus : les protéases à sérine extracellulaires et la reeline. Des protéases à sérine ont en effet été rapportées comme modulateurs de la migration neuronale et la reeline a un rôle essentiel dans cette migration ainsi que dans le bon positionnement final des neurones. La reeline existe sous la forme du polypeptide pleine longueur de 400K et sous la forme de fragments de 300K et de 180K portant la terminaison NH<sub>2</sub> native. Le profil d'expression et le rôle de ces fragments durant le développement ainsi que les mécanismes responsables de leur formation sont peu connus. La reeline se lie à ses récepteurs ApoER2 et VLDLR, ce qui stimule la phosphorylation de la protéine intracellulaire Dab-1 et, plus distalement, la phosphorylation de la cofiline, une protéine régulatrice de l'assemblage des filaments d'actine. D'autre part, l'AMPC et les kinases ERK1/2 activées par des mitogènes sont des molécules signalisatrices capables de moduler la morphologie et la motilité cellulaires.

Les résultats du premier volet de la recherche montrent que le traitement des neurones avec la CP non seulement induit leur agrégation mais stimule aussi la formation du fragment 300K de la reeline. La formation de ce fragment est postérieure à l'agrégation. L'ajout des inhibiteurs de protéases SBTI et aprotinine abolit l'agrégation des neurones et la formation de la reeline 300K, indiquant qu'une ou des protéases à sérine extracellulaires sont impliquées dans ces actions de la CP. Globalement, les résultats suggèrent deux modèles de relation entre la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K : un modèle dans lequel la génération de la reeline 300K est une conséquence de la neuroagrégation et un modèle dans

lequel les deux phénomènes sont indépendants l'un de l'autre. Comme indiqué plus bas, les études du troisième volet de la recherche favorisent le dernier modèle.

Dans le deuxième volet, nous avons voulu déterminer si l'action de la CP sur la reeline dans des cultures de neurones naissants P19 pouvait exister *in vivo*. Nous avons comparé, par immunobuvardage, les profils d'expression ontogéniques de la CP, la reeline et la cofiline et ce, dans des cerveaux de souris de type sauvage et de souris déficientes en CP ( $CP^{-/-}$ ). Chez les souris de type sauvage, la CP est détectée dès le jour embryonnaire 12.5, ses niveaux augmentent jusqu'à la naissance et demeurent soutenus jusqu'à l'âge adulte. L'expression globale de la reeline suit à peu près celle de la CP mais les niveaux du fragment 300K sont plus élevés durant la période embryonnaire qu'après la naissance. La cofiline est fortement phosphorylée au cours de la première semaine postnatale. Par comparaison, chez les souris  $CP^{-/-}$ , la reeline 300K est peu détectée avant la naissance et la déphosphorylation postnatale de la cofiline survient plus tôt. La CP a donc un impact sur l'expression de la reeline et de la cofiline durant le développement du cerveau. L'expression accrue de la reeline 300K dans les cerveaux embryonnaires de type sauvage par rapport aux cerveaux déficients en CP valide les résultats obtenus avec les neurones P19.

Enfin, les études du troisième volet de la recherche, basées sur l'utilisation d'agents pharmacologiques, ont montré que l'action agrégative de la CP et l'influence de la protéine sur la reeline peuvent se produire indépendamment l'une de l'autre. Ainsi, l'AMPc a inhibé l'action neuroagréative de la CP sans empêcher la génération de la reeline 300K et des inhibiteurs de la signalisation d'ERK1/2 ont diminué le taux de formation de la reeline 300K sans affecter la neuroagrégation.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus *ex vivo* et *in vivo* appuie l'hypothèse d'un rôle possible de la CP dans le développement du système nerveux. La définition de ce rôle demande des investigations supplémentaires.

**Mots-clés :** Céruloplasmine, Reeline, Protéases à sérine, Cofiline, AMPc, PKA, ERK, Neurones P19, développement du système nerveux, Immunobuvardage



## INTRODUCTION

Les maladies qui touchent la santé mentale sont malheureusement encore aujourd'hui un sujet tabou dans notre société. Heureusement, de plus en plus de médias abordent ce sujet et plusieurs personnalités connues acceptent d'être les porte-étendards de cette cause. À titre d'exemple au cours de la dernière année, l'humoriste Michel Mpambara et l'auteur-compositeur-interprète Stefie Shock se sont associés à la campagne « Cause pour la cause » (Bell Canada, 2012), une campagne publicitaire visant à lutter contre la stigmatisation vis-à-vis la maladie mentale et permettre de soutenir financièrement la recherche visant à mieux comprendre et traiter les maladies mentales. Au Canada, on estime à 20 % la proportion des gens qui seront atteints d'une maladie mentale au cours de leur vie (Association Canadienne pour la santé mentale, 2012). Des études épidémiologiques indiquent que bon an mal an, près de 3 % des Canadiens sont diagnostiqués pour une maladie mentale grave (Santé Canada, 2012).

Par maladie mentale, on désigne l'ensemble des problèmes affectant l'esprit. Ceci inclut les troubles anxieux, la dépression, le trouble excessif-compulsif et les phobies. Il existe aussi des troubles mentaux plus graves comme l'épilepsie, le retard mental, la bipolarité, l'autisme et la schizophrénie. Dans tous les cas, il s'agit de manifestations d'un dysfonctionnement psychologique et souvent biologique. Ces perturbations provoquent différentes sensations de malaises, des bouleversements émotionnels et/ou intellectuels, de même que des difficultés de comportement et d'apprentissage. On ne connaît pas parfaitement toutes les causes pour chacun de ces troubles/désordres neurologiques. Les recherches à ce jour indiquent l'implication de facteurs génétiques, biologiques et environnementaux. La personnalité de l'individu compte aussi mais cet aspect demeure flou puisque la personnalité dépend aussi des facteurs mentionnés ci-dessus. Néanmoins, il semble y avoir un dénominateur commun pour ces troubles mentaux; ils auraient une composante reliée à des déficiences du développement du cerveau. On dit de ces troubles qu'ils sont neurodéveloppementaux. Par comparaison, les maladies comme celles de Parkinson et d'Alzheimer sont dites neurodégénératives parce qu'elles sont reliées au vieillissement.

Le cerveau est sans contredit un des organes les plus complexes du corps humain et dont le fonctionnement contient encore bien des mystères. Le cerveau est constitué de quelques cent milliards de cellules spécialisées appelées neurones. Chacun de ces neurones établit des connexions avec des neurones voisins via une structure particulière appelée synapse. L'ensemble des neurones et des synapses forment ainsi un vaste réseau de communication qui couvre tout l'organisme. De plus, le cerveau est aussi composé de cellules gliales, lesquelles regroupent les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules de la microglie. Cela donne un aperçu de l'immensité de la tâche à réaliser pour essayer de comprendre les fonctions de cet organe. Lors du développement embryonnaire du cerveau, les cellules souches qui deviendront des neurones doivent prendre plusieurs décisions importantes : proliférer ou non, se différencier ou non, établir des connexions ou non. De plus, les neurones devront se déplacer afin de rejoindre une destination précise à l'intérieur du cerveau et d'autres régions du système nerveux en construction, pour ensuite établir les bonnes connexions avec les bonnes cellules. Les mécanismes moléculaires qui contrôlent ces décisions sont à la base du développement normal et, ultimement, du bon fonctionnement du système nerveux. Des défauts dans l'une ou l'autre de ces étapes cruciales du développement neuronal seraient à l'origine de nombreuses maladies neurodéveloppementales. Ainsi, il apparaît impératif d'approfondir notre compréhension du développement du cerveau par le biais de la recherche médicale et fondamentale. Dans ce contexte, l'utilisation du modèle cellulaire P19, un modèle de cellules souches embryonnaires capables de se différencier en neurones qui ressemblent à ceux du système nerveux central, offre un moyen pertinent de contribuer à mieux comprendre des aspects du développement du cerveau.

Tel que mentionné, le développement du cerveau dépend de plusieurs étapes clés qui font intervenir plusieurs molécules comme des facteurs de croissance, des protéases, des molécules d'adhésion cellulaire et de guidance ainsi que des composantes de la matrice extracellulaire. Depuis maintenant plus de 15 ans, l'équipe du Dre Joanne Paquin, en collaboration avec le groupe du Dr Mircea-Alexandru Mateescu, étudie les propriétés d'une protéine multifonctionnelle que l'on retrouve abondamment dans la circulation sanguine mais qui est également exprimée de manière endogène dans le cerveau par les cellules gliales : la céruloplasmine (CP). Les travaux ont notamment permis de montrer que la CP peut induire,

*in vitro* l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires P19 (Maltais *et al.*, 2003). Cette action soulève la possibilité d'un rôle de la CP dans l'organisation du système nerveux en développement, une hypothèse qui est au cœur même des travaux de cette thèse. Ainsi, l'objectif de la présente thèse porte sur la compréhension de cette action nouvellement identifiée de la CP sur les neurones, sur l'élucidation des mécanismes moléculaires qu'elle fait intervenir et sa signification physiologique dans le contexte du développement neuronal. Les travaux de cette thèse ont permis de montrer que l'agrégation de neurones P19, induite par la CP, fait intervenir une activité protéolytique et est associée à un changement du profil protéique de la reeline, une protéine importante dans le développement du cerveau. L'utilisation d'agents pharmacologiques montrent que les actions neurotrophiques de la CP sur les neurones P19 sont sensibles aux niveaux d'AMPc, d'activité de la protéine-kinase A ainsi que la protéine-kinase activée par mitogènes (MAPK) ERK1/2. Finalement, un volet *in vivo* des travaux de cette thèse a établi le profil d'expression de la CP au cours du développement embryonnaire et post-natal du cerveau chez les souris de type sauvage, et comparé le profil développemental de la reeline ainsi que celui de la cofiline, une protéine cible de la reeline, chez des souris de type sauvage et des souris qui n'expriment pas la CP ( $CP^{-/-}$ ).

La présente thèse se divise en trois parties. La première présente l'état des connaissances actuelles concernant les éléments clés de ce travail, soient la CP, le développement du cerveau, la reeline, les voies de signalisation de l'AMPc et des MAPK, ainsi que le modèle de cellules souches embryonnaires P19. Les schémas, les illustrations de même que les tableaux-résumés présentés dans cette partie ont été conçus et sélectionnés avec soin pour expliciter certains concepts phares de la thèse. La première partie établit donc le contexte essentiel de la thèse. La deuxième partie présente l'hypothèse et les objectifs de travail et regroupe les résultats expérimentaux de l'auteur, rapportés sous la forme de trois articles. La troisième partie fait le bilan de l'ensemble des travaux et en présente les conclusions générales, les recommandations ainsi que les perspectives futures en regard à ce projet.

**PARTIE I**  
**ÉTAT DES CONNAISSANCES**

## CHAPITRE I : LA CÉRULOPLASME

### 1.1 Généralités

Des études publiées par les Drs J. Paquin, M.A. Mateescu ont montré que la céruloplasmine (CP) induit l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules P19, un modèle de cellules souches embryonnaires (Maltais *et al.*, 2003). Il est possible que cette neuroagrégation soit un reflet d'un rôle de la CP dans l'organisation du système nerveux en développement. Pour bien camper le contexte du présent travail, ce chapitre résumera d'abord les propriétés de la CP ainsi que celles de ses récepteurs potentiels, les quelques connaissances accumulées concernant l'ontogénèse de la CP, et présentera les liens qui existent entre l'expression de la CP et les désordres du cerveau.

### 1.2 Découverte de la CP

La découverte de la céruloplasmine (CP) remonte aussi loin qu'au milieu des années 1800. À cette époque, quelques chercheurs s'intéressaient à l'étude d'un groupe bien particulier d'enzymes, les oxydases à cuivre, lesquelles étaient isolées des plantes. Certains chercheurs ont par la suite eu l'idée que de telles enzymes pourraient ne pas être exclusivement réservées au monde végétal. Durant près de 70 ans, l'existence possible de cupro-oxydases dans le plasma sanguin a été l'objet de nombreux débats. Ce n'est qu'en 1938 que deux chercheurs, T. Mann et D. Keilin de l'Université de Cambridge, ont pour la première fois identifié une protéine à cuivre contenue dans le sang de mammifère (Mann et Keilin, 1938). Ils ont purifié et cristallisé cette protéine, une protéine bleue de 35 kDa qu'ils ont nommée « hæmocuprein ». Malheureusement, cette protéine s'est avérée n'avoir aucune activité enzymatique, donc aucune activité oxydasique normalement trouvée aux oxydases isolées de plantes. En 1944, C. Holmberg et son collègue C.-B. Laurell, de l'Université de Lund en Suède, détectent dans un échantillon de sérum sanguin la présence d'une activité oxydasique au moyen d'un substrat bien connu à cette époque comme étant spécifique aux oxydases, le *p*-phénylènediamine (*p*PD). Qui plus est, cette activité semblait de toute

évidence reliée à la présence d'une protéine contenant des atomes de cuivre dans sa structure (Holmberg, 1944). Quatre ans plus tard, ces mêmes chercheurs isolent pour la première fois, à partir de sérum de porc, une nouvelle protéine oxydasique à cuivre ayant une taille approximative de 150 kDa et qui, selon leur estimation, comporte environ huit atomes de cuivre par molécule. Ils nommèrent cette protéine « cœruloplasmin », ce qui signifie « sky-blue plasma protein » (Holmberg et Laurell, 1948). C'est donc à Holmberg et Laurell que revient le mérite de la découverte de la CP.

Bien que la lettre « o » dans le nom original de la protéine ne soit pas prononcée, cette orthographe du mot fut conservée par ses découvreurs durant plusieurs années. Cependant, due à une mauvaise typographie de l'époque, la ligature des lettres « o-e » (œ) du mot « cœruloplasmin » était pratiquement non distinguable de la ligature « a-e » (æ), si bien que les éditeurs ont commencé à utiliser la forme « cæruloplasmin », appellation qui deviendra celle employée par les Britanniques. L'épellation la plus couramment utilisée de nos jours, céruloplasmine (« ceruloplasmin ») est apparue pour la première fois dans les travaux de recherche publiés par Herb Scheinberg et David Gitlin (Scheinberg et Gitlin, 1952). Depuis sa découverte, plusieurs fonctions ont été attribuées à la CP dans l'organisme (voir section 1.4) et cette protéine suscite encore de nos jours l'intérêt de plusieurs chercheurs qui tentent de définir l'étendue de son rôle biologique.

### 1.3 Caractéristiques structurales de la CP

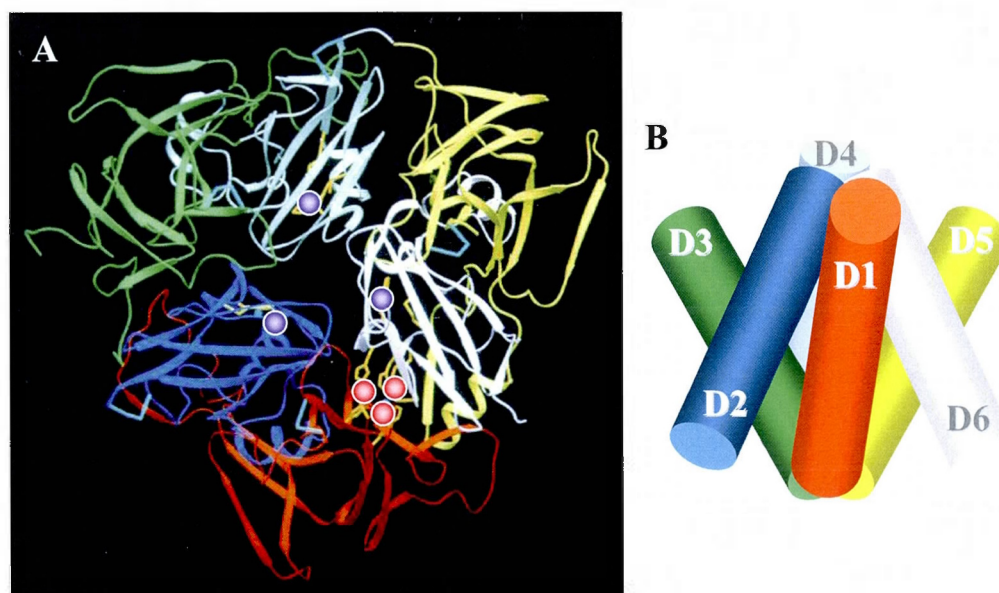
La CP fait partie de la famille des métalloprotéines cuivriques. Cette famille de protéines se scinde en deux groupes : d'abord les protéines à cuivre bleu, parmi lesquelles on retrouve la CP, mais également la laccase, l'ascorbate oxydase, l'hémocyanine et l'azurine, ainsi qu'un second groupe composé de protéines à cuivre non bleu, telles l'amine-oxydase sérique et les diamine-oxydases (David et Patel, 2000).

La CP (EC 1.16.3.1) est une glycoprotéine du groupe des  $\alpha_2$ -globulines de par son patron électrophorétique, avec une masse moléculaire approximative de 132 kDa par électrophorèse sur gel (Qian et Ke, 2001). Des études effectuées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF : Ionisation par désorption au laser sur matrice-temps d'envol) ont établi la taille moléculaire



de la protéine à 125 kDa pour la CP bovine et à 129 kDa pour la CP humaine (Boivin *et al.*, 2001). La variation de la taille moléculaire de la CP s'explique par l'hétérogénéité des groupements carbohydrates, conséquence d'une modification post-traductionnelle (i.e. N-glycosylation) (Healy et Tipton, 2007). Chez l'humain, la CP consiste en une seule chaîne polypeptidique constituée de 1046 résidus d'acides aminés et comporte notamment 8,4 % de glucides dont 3,5 % d'hexose, 2,6 % de N-acétylglucosamine, 2,1 % d'acide sialique et 0,24 % de fucose (Ryden et Bjork, 1976 ; Zaitsev *et al.*, 1999). Il existe un degré de conservation très élevé de la séquence peptidique de même que de l'expression génique de la CP chez diverses espèces animales (Calabrese *et al.*, 1983 ; Lockhart et Mercer, 1999). La cristallographie aux rayons-X de la CP humaine (fig. 1.1A), à une résolution de 3.1 Angström, révèle qu'une molécule de CP se compose de six domaines, chacun comportant de 330 à 430 acides aminés, arrangés en deux triades, l'une composée des domaines pairs et l'autre des domaines impairs, formant deux pyramides triangulaires emboîtées et permutées l'une par rapport à l'autre (fig. 1.1B) (Vachette *et al.*, 2002 ; Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). L'arrangement des pyramides est similaire bien que la structure des domaines pairs et impairs se ressemble peu. La conformation tridimensionnelle est assurée entre autres par la présence de cinq ponts de type disulfure situés à la base des domaines 1 à 5 (David et Patel, 2000).

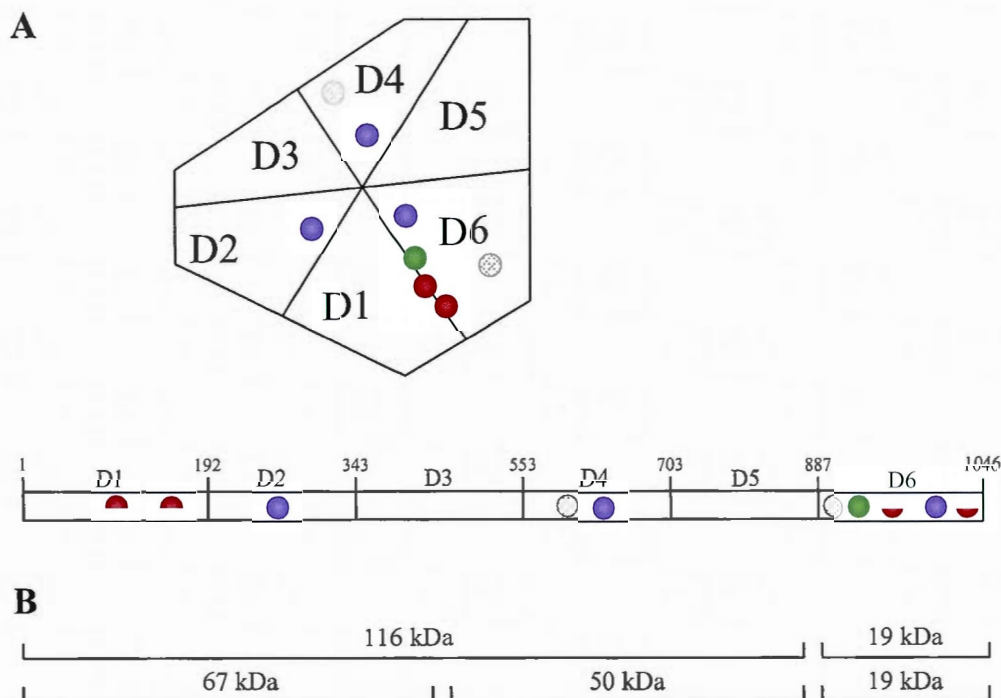
Une caractéristique importante de la CP est qu'elle possède six atomes de cuivre « permanents » (fig. 1.1A et 1.2A) ainsi que deux sites de liaison supplémentaires occupés de manière partielle par des atomes de cuivre « labiles » (Lindley *et al.*, 1997 ; Zaitseva *et al.*, 1996). Il a été rapporté que d'autres sites supplémentaires de liaison de cuivre « labiles » puissent exister, jusqu'à dix, mais cette information n'est pas bien documentée (Healy et Tipton, 2007). Cette propriété de la CP de lier partiellement des atomes de cuivre serait importante pour son rôle de transporteur plasmatique de cet ion métallique (Healy et Tipton, 2007). Les six atomes de cuivre « permanents », retrouvés sous forme  $\text{Cu}^{2+}$ , sont répartis dans les domaines pairs de la protéine ainsi qu'à l'interface des domaines 1 et 6 (fig 1.2A). Ils sont classifiés selon trois types de coordination qui influencent leurs propriétés spectroscopiques. Les trois atomes de cuivre localisés dans les domaines pairs (2, 4 et 6) sont de type I. Ils sont coordonnés à deux résidus d'histidine, un de cystéine et un de méthionine (Vachette *et al.*, 2002). Ils sont responsables de la couleur bleu céruléen de la protéine ainsi que de son



**Figure 1.1 Représentation tridimensionnelle de la CP humaine.** A Diffraction de rayons X montrant les six domaines de la CP représentés par six couleurs différentes, rouge (D1), bleu (D2), vert (D3), bleu pâle (D4), jaune (D5) et blanc (D6). La localisation des six atomes de cuivre permanents est représentée par des cercles, les cercles bleus correspondant aux ions de cuivre de type 1 et les cercles rouges correspondant aux ions de cuivre de type 2 et 3 contenus dans le groupement trinucéaire. B Les six domaines de la CP sont arrangés en deux triades, l'une composée des domaines pairs et l'autre des domaines impairs, formant deux pyramides triangulaires emboîtées et permutées l'une par rapport à l'autre. Figure adaptée de Zaitseva *et al.* (1996).

absorbance à 610 nm (Fox, Mukhopadhyay et Ehrenwald, 1995 ; Machonkin *et al.*, 1998). Leur présence est nécessaire à l'activité enzymatique de la CP car ils sont impliqués dans le transfert des électrons à titre de receveurs initiaux d'ions de fer (Puchkova *et al.*, 1997), substrat de l'activité ferroxidasique de la CP. Les trois autres atomes de cuivre forment le cœur trinucéaire catalytique de la CP, à la jonction des domaines 1 et 6. Ce site est constitué d'un atome de cuivre de type II, qui se retrouve dans le domaine 6, et deux atomes de type III, dont les sites de liaison sont partagés entre les domaines 1 et 6 de la CP (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). Le cuivre de type II, aussi nommé cuivre « blanc », est coordonné à deux résidus d'histidine ainsi qu'à un résidu d'acide aminé à caractère polaire, et est détectable par résonance paramagnétique électronique et non par absorbance (Calabrese et Carbonaro, 1986 ; Calabrese *et al.*, 1988 ; Zaitseva *et al.*, 1996). Les deux autres atomes de cuivre (type III) du





**Figure 1.2 Représentation schématique de la structure de la CP.** A Les relations spatiale et linéaire des six domaines (D1-D6) de la protéine sont montrées, ainsi que la localisation des atomes de cuivre (●, type I; ●, type II; ●, type III; ●, labile). Le cœur trinucéaire catalytique de la CP est situé à la jonction des domaines D1 et D6 de la CP B Principaux fragments de la CP générés par activité protéolytique *in vivo*. Figure inspirée de Takahashi *et al.* (1984) et Zaitseva *et al.* (1996).

centre catalytique sont coordonnés chacun à trois résidus d'histidine et un atome électronégatif tel l'oxygène ou l'azote. Ils sont diamagnétiques et montrent une absorbance maximale à 330 nm (Zaitseva *et al.*, 1996). C'est lors de l'acheminement des électrons, médié par les atomes de cuivre I, vers le groupe de cuivre trinucéaire (types II et III) que ces derniers rendent possible la réduction de l'oxygène (David et Patel, 2000). La CP peut également lier des atomes de cuivre labiles au niveau des domaines 4 et 6 qui ne participeraient pas à l'activité d'oxydase (Lindley *et al.*, 1997).

La présence des ions cuivriques au sein de la structure de la CP est importante. Il est montré que la CP dépourvue de ses atomes de cuivre, la forme apoCP, n'a pas d'activité enzymatique. L'apoCP est une forme plutôt instable de la protéine et conséquemment est

rapidement dégradée (Gitlin, 1998). Il a été démontré que seulement les ions de cuivre de type I peuvent être soustraits puis réincorporés dans la structure de la protéine sans engendrer d'effets structuraux notables. Leur réinsertion permet aussi de restaurer l'activité enzymatique de la protéine. À cause de leur impact structurel peu prononcé, les ions de Cu de type I (avec les ions de Cu labiles) pourraient être impliqués dans un rôle possible de la CP dans le transport systémique du cuivre. Toutefois, la perte du cuivre de type III entraîne, quant à elle, la perte irréversible de la conformation tridimensionnelle de la protéine de même que de son activité catalytique (Vachette *et al.*, 2002).

Il a été rapporté que la CP possède des sites sensibles à l'action protéolytique dans sa structure (fig. 1.2B) (Takahashi, Ortel et Putnam, 1984). Ainsi, la protéine purifiée du plasma peut être obtenue sous forme de deux fragments, avoisinants 110-116 kDa et 16-20 kDa respectivement. Une métalloprotéase présente dans le plasma pourrait être responsable de ce clivage (Fox, Mukhopadhyay et Ehrenwald, 1995). Une méthode de purification de la CP par chromatographie sur aminoéthyl(AE)-agarose décrite par Wang et coll. (1994) et Mateescu et coll. (1999) a permis l'obtention d'une protéine présentant un grand degré de pureté et d'intégrité, c'est-à-dire homogène lorsque analysée électrophorétiquement (une bande unique, sinon majeure, à 132 kDa). La protéine ainsi purifiée présente un rapport  $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  d'une valeur égale ou supérieure à 0,04, l'absorbance à 610 nm étant due au centre cuivrique bleu et l'absorbance à 280 nm au contenu protéique. Cette valeur est un critère solidement établi pour juger de la pureté ainsi que de l'intégrité conformationnelle de la CP (Lovstad, 1981). La CP existe également sous une forme possédant un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) (voir section 1.4). Cette CP est exprimée notamment dans le cerveau à la surface d'astrocytes (Patel et David, 1997 ; Salzer *et al.*, 1998).

#### 1.4 Biosynthèse et expression de la CP

Le gène codant pour la CP a été identifié sur le chromosome 3q23-q24. Il est composé de 20 exons et a une taille de 65 kilopaires de bases (kpb) (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). Deux transcrits de la CP peuvent être retrouvés (4,2 et 3,7 kpb), qui génèrent une chaîne polypeptidique de 1046 acides aminés. Ces différences de taille s'expliquent par un polyadénylation alternative dans la région 3' du transcrit (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005).

La CP est majoritairement synthétisée par les hépatocytes, d'abord sous la forme apoCP qui ne contient pas ses atomes de cuivre « permanents ». Elle est par la suite chargée en ions cuivriques pour finalement être relâchée dans la circulation systémique où elle est notamment responsable du transport de 70 à 95 % du cuivre plasmatique (Bowman, 1993 ; Floris *et al.*, 2000). Un défaut d'incorporation des atomes de cuivre dans la CP résulte en la sécrétion de la forme apoCP, une forme dépourvue d'activité enzymatique et instable qui sera rapidement catabolisée. On estime chez un individu en bonne santé qu'il y a près de 10 % de la totalité de la CP circulante qui se trouve sous la forme apoCP (Healy et Tipton, 2007). Avant son largage dans la circulation sanguine, la CP est modifiée par glycosylation post-traductionnellement. Il est à noter que la glycosylation de la CP n'est pas nécessaire à l'incorporation du cuivre dans la CP mais elle a d'importantes répercussions sur la demi-vie de la protéine et possiblement sur ses fonctions (Healy et Tipton, 2007). Il a ainsi été observé que la CP de rat dépourvue d'acide sialique présente une demi-vie de seulement 15 min alors que la valeur est de 56 h pour la forme native glycosylée (Morell *et al.*, 1968).

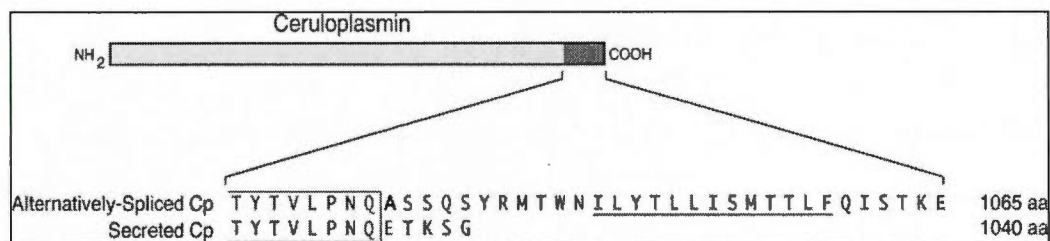
Bien que la CP soit principalement synthétisée dans le foie, bon nombre d'études récentes ont démontré que les cellules hépatocytaires ne sont pas les seules à synthétiser la CP. C'est à l'équipe de Yang et coll. (1986) que revient la primeur d'avoir détecté la première fois, par hybridation *in situ*, la présence d'ARNm codant pour la CP dans les lymphocytes T, les macrophages et les monocytes humains. L'année suivante, on rapporte la présence de grandes quantités de CP dans les lignées cellulaires de cancer du colon et du sein (Kunapuli *et al.*, 1987). Les études qui ont suivi ont montré l'expression génique de la CP dans le placenta et les testicules (Aldred *et al.*, 1987), dans les glandes mammaires (Jaeger, Shimizu et Gitlin, 1991), dans les poumons où une augmentation de l'ARNm a été observée à la suite d'une hyperoxie (Fleming, Whitman et Gitlin, 1991), et dans les reins (Linder *et al.*, 1998).

Différents groupes de chercheurs ont contribué à établir l'existence d'une CP synthétisée dans le cerveau et un groupe de chercheurs a mis en évidence l'existence d'une forme de la CP comportant l'ancre GPI. C'est en effectuant une biopsie d'une patiente asiatique présentant des symptômes de dégénérescence neurologique que les chercheurs ont observé la présence de dépôts de fer dans le cerveau, corrélée à une faible concentration sérique en CP

(Miyajima *et al.*, 1987). Il a été démontré qu'une maladie liée à une déficience de la CP, l'acéruoplasminémie, pouvait engendrer une altération fonctionnelle du métabolisme du fer dans le cerveau (Harris *et al.*, 1995). La présence de la CP a été ainsi observée par hybridation *in situ* dans le tissu cérébral (Klomp et Gitlin, 1996). Cette forme de CP ne provient pas de la circulation systémique puisque la CP contenue dans le sérum sanguin ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Klomp et Gitlin, 1996 ; Mollgard *et al.*, 1988). Ce sont les travaux menés par Patel et David (1997) qui ont permis de démontrer, par des études d'immunohistochimie, qu'il existe une forme de la CP dans le cerveau qui comporte un groupement GPI. Cette CP-GPI est ancrée à la surface de cellules gliales. Elle est synthétisée précisément par les cellules de Schwann ainsi que par une sous-population d'astrocytes qui bordent le réseau microvasculaire. Cette sous-population astrocytaire est considérée comme étant un constituant de la barrière hémato-encéphalique (Patel et David, 1997). À l'exception du groupement GPI, la CP cérébrale est immunologiquement semblable à la CP sérique (Patel et David, 1997 ; Salzer *et al.*, 1998). C'est par suite d'un épissage alternatif de l'ARNm, au niveau des exons 19 et 20 du gène, que la forme conjuguée au GPI de la CP est générée (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). Cet épissage alternatif résulte en la substitution des cinq acides aminés C-terminaux de la CP par une séquence de 30 acides aminés hydrophobes (fig. 1.3) qui signale le site de réception du groupement GPI (Patel, Dunn et David, 2000). Peu de temps après les travaux de Patel et David (1997), il a été montré que la CP-GPI est aussi exprimée à la surface des cellules de Sertoli situées dans la paroi des tubes séminifères du testicule (Fortna, Watson et Nyquist, 1999). Enfin, notons qu'une étude faite très récemment chez les rongeurs rapporte l'expression de la CP-GPI dans d'autres organes, soient le foie, la rate, les reins et le cœur (Mostad et Prohaska, 2011). Dans le cerveau, c'est la forme CP-GPI que l'on retrouve de manière prédominante et elle joue un rôle crucial dans la défense anti-oxydante et sur l'homéostasie du fer (Marques *et al.*, 2012).

Le catabolisme de la CP circulante a lieu dans le foie par l'intermédiaire des lysosomes hépatiques. La demi-vie de la CP humaine est de 5,5 jours, alors qu'elle est de 12 et 54 h respectivement chez le rat et le lapin (Frieden et Hsieh, 1976 ; Healy et Tipton, 2007). Une fois le cycle biologique de la CP complété, elle devient partiellement dépouillée de ses atomes de cuivre, puis est captée au niveau du foie par des récepteurs spécifiques (Tavassoli,





**Figure 1.3 Comparaison des séquences C-terminales de la CP sécrétée et la CP-GPI.** La forme ancrée à la membrane est obtenue par épissage alternatif. Les acides aminés communs aux deux formes de la protéine sont encadrés. L'ajout de 25 acides aminés à l'extrémité COOH de la séquence protéique permet la conjugaison de la CP au groupement GPI. Les acides aminés soulignés constituent la séquence reconnue par la machinerie enzymatique de cette conjugaison. Tirée de Patel *et al.* (2000).

Kishimoto et Kataoka, 1986). Les cellules de l'endothélium hépatique lient puis internalisent la CP du côté luminal par endocytose médiée par un récepteur. Après avoir traversé l'endothélium via un système vésiculaire, la CP est excrétée du côté abluminal, dans l'espace de Disse, où elle est reconnue et prise en charge par les hépatocytes, par un mécanisme qui implique un récepteur des asialoglycoprotéines (Omoto et Tavassoli, 1990). Le catabolisme de la CP synthétisée dans les tissus extra-hépatiques n'est pas connu.

Il existe plusieurs conditions physiologiques et facteurs susceptibles d'influencer la quantité de CP circulante produite dans l'organisme. Les concentrations de CP augmentent notamment durant la phase aiguë de la réponse inflammatoire, la grossesse, l'infarctus du myocarde, l'hyperthyroïdisme et certains types de cancer (Cousins, 1985 ; Healy et Tipton, 2007). La CP présente une microhétérogénéité lors de la réponse inflammatoire, laquelle microhétérogénéité résulte de variations structurales au niveau des chaînes de carbohydrates (Mackiewicz *et al.*, 1987). À la suite d'un stimulus lié à une condition inflammatoire, la concentration de CP sérique humaine augmente lentement jusqu'à atteindre un niveau de deux à trois fois supérieur au niveau normal lequel, selon l'âge, se situe autour de 150 à 300 µg/mL de sérum. Chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, la concentration en CP sérique peut augmenter jusqu'à près de 900 µg/mL, corrélée à une élévation significative de l'activité oxydasique spécifique de la protéine (Louro *et al.*, 2000).

Des études réalisées *in vitro* ont démontré que certaines hormones agissent sur la biosynthèse et la sécrétion de la CP. C'est le cas de l'adrénaline qui accroît la quantité d'activité oxydasique ainsi que la concentration d'ions de cuivre dans le sérum (Evans, 1973). L'œstrogène peut aussi augmenter la synthèse de la CP sérique (Ganaraja, Pavithran et Ghosh, 2004). Par ailleurs, une déficience en fer peut également entraîner une augmentation du taux de CP plasmatique (Mukhopadhyay *et al.*, 1997). Enfin, il a été mis en évidence dans une lignée cellulaire d'hépatome humain que l'interleukine-1 (IL-1), le facteur de nécrose tumoral (TNF) et le facteur-1 de stimulation hépatique (HSF1) induisent chacun la synthèse de CP (Mackiewicz *et al.*, 1987).

Les recherches plus contemporaines ont étudié les régions régulatrices situées sur le gène de la CP de même que les facteurs qui influencent la transcription de ce gène. Les travaux de Mukhopadhyay et coll. (2000) ont mis en évidence un mécanisme moléculaire expliquant l'augmentation de la concentration sérique de CP provoquée par une déficience en fer ionique dans l'organisme. Ce mécanisme implique la présence de trois paires d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) au niveau de la région 5' du gène de la CP humaine ainsi que la liaison du facteur-1 inductible par l'hypoxie (HIF-1) à l'un de ces HRE (Mukhopadhyay, Mazumder et Fox, 2000). Il a également été rapporté qu'une interaction entre le promoteur du gène de la CP de rat et les protéines  $\alpha$  et  $\beta$  se liant aux séquences « CCAAT/enhancer » pouvait être impliquée (Bingle, Fleming et Gitlin, 1993). Fait intéressant, l'expression de la CP peut être régulée post-transcriptionnellement mais avant la traduction. Ainsi, la synthèse de la CP peut être contrôlée par l'interaction de la protéine de liaison à l'ARN, inductible par l'interféron- $\gamma$ , et la région 3' non traduite de l'ARNm de la CP (Mazumder et Fox, 1999). Conséquemment, l'association du transcrit de la CP avec les ribosomes est bloquée et la traduction suspendue.

### 1.5 Principaux rôles associés à la CP

La CP aurait différents rôles biologiques, ce qui fait d'elle une protéine multifonctionnelle. Certains de ces rôles seraient liés à ses activités oxydasique (*e.g.* régulation des amines biogènes) et ferroxidasique (*e.g.* régulateur du métabolisme du fer, enzyme antioxydante), ainsi qu'à sa capacité de transporter le cuivre (*e.g.* régulateur du métabolisme du cuivre, angiogenèse). D'autres rôles sont proposés sur la base des conditions

qui stimulent la biosynthèse de la CP (*e.g.* inflammation). Enfin, de nouveaux rôles ont été soulevés dont les mécanismes demeurent inconnus.

### 1.5.1 Activité catalytique de la CP

La CP est une oxydase (EC 1.16.3.1) qui catalyse l'oxydation de différents substrats. Toutefois, la CP fait partie d'un type particulier d'oxydases puisqu'elle génère de l'eau, contrairement aux oxydases dites classiques qui libèrent du peroxyde d'hydrogène (David et Patel, 2000). Outre la CP, on retrouve également la laccase et l'ascorbate oxydase végétales qui produisent elles aussi de l'eau. La CP catalyse l'oxydation de plusieurs substrats *in vitro* incluant des produits phénoliques et amines aromatiques tels les catécholamines, des aminophénols, des amines biogènes et des diamines aromatiques, dont le *p*PD (Sunderman et Nomoto, 1970 ; Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). À ce propos, la CP présente une forte affinité pour le *p*PD, qui est depuis plus de 30 ans le substrat le plus couramment utilisé pour le dosage de l'activité oxydasique *in vitro* (Fox, 2003).

La CP est également reconnue en tant que ferroxidase. Cette fonction, essentielle à l'organisme, fut démontrée pour la première fois en 1960 par les chercheurs Curzon et O'Reilly, du « National Hospital in London » situé en Angleterre (Curzon et O'Reilly, 1960). Ils ont décrit le mécanisme qui permet, en présence de la CP, d'oxyder les ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pour former des ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Le  $\text{Fe}^{2+}$  est le substrat pour lequel la CP présente l'affinité la plus forte (Curzon, 1961 ; Frieden, 1981). Cette activité ferroxidasique fait de la CP un antioxydant important (voir section 1.5.4) et un régulateur métabolique essentiel du fer (voir section 1.5.7). Il a été rapporté plus récemment que la CP peut aussi catalyser l'oxydation de l'ion cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) en ion cuivrique ( $\text{Cu}^{2+}$ ) dans une réaction qui a des cinétiques similaires à celles de l'oxydation du fer (Stoj et Kosman, 2003).

L'activité enzymatique de la CP peut être inhibée par différents types de molécules : des anions organiques, des carboxylates, des composés thiols, des agents chélateurs, des hydrazines, des 5-hydroxyindoles et certains ions métalliques (Frieden et Hsieh, 1976).

### 1.5.2 Régulateur des amines biogènes

Des études suggèrent que la CP puisse réguler, via son activité oxydasique, la concentration d'amines biogènes, tels la sérotonine et les amines de type catécholamine comme la noradrénaline et la dopamine, et ce aussi bien dans le sérum que dans les tissus (de Mol, 1985). Le mécanisme proposé implique l'interaction de ces composés avec la CP, via des sites de liaison potentiels dans le domaine 6 de la CP, pour permettre le transfert de charges entre l'amine biogène et les ions cuivriques de la CP (de Mol, 1985 ; Zaitsev *et al.*, 1999). D'autre part, des études ont montré que certains tranquillisants et antidépresseurs (*e.g.* phénothiazine, phénylakylamine) peuvent influencer sur l'oxydation (et la concentration) des amines biogènes catalysée par la CP (Barrass *et al.*, 1974 ; de Mol, 1985). Comme la CP se retrouve non seulement dans la circulation systémique mais aussi dans le cerveau, riche en amines biogènes, il est possible que la CP influe sur le fonctionnement de certains processus tels que la neurotransmission et le développement neuronal (Shepherd, 1994 ; Vassiliev, Harris et Zatta, 2005).

### 1.5.3 Transport du cuivre

Les grandes civilisations anciennes ont reconnu beaucoup d'importance au cuivre dans la promotion d'une bonne santé (Fox, 2003). Des investigations scientifiques effectuées au début du 20<sup>e</sup> siècle ont su démontrer l'importance du cuivre au sein du métabolisme humain. Ainsi, en 1928, l'équipe composée de Hart, Elverhjem et coll. a montré pour la première fois le rôle important du cuivre dans la biosynthèse de l'hémoglobine et ce, par le biais d'études portant sur la chlorose, une forme particulière d'anémie sidéropénique chez les jeunes filles (Fox, 2003). Cette découverte a considérablement contribué aux idées déjà véhiculées à l'époque concernant le rôle spécifique du cuivre dans le métabolisme du fer et la formation du sang. Depuis, il a été démontré que le cuivre est impliqué dans le fonctionnement de plusieurs enzymes dont la CP. Également, cet élément influe sur la croissance, l'élaboration d'une bonne ossature, la maturation des globules rouges et blancs, la contractilité du myocarde, le transport du fer et de l'oxygène, le métabolisme du glucose et le développement du cerveau notamment en affectant les niveaux de certains neurotransmetteurs (Gambling, Kennedy et McArdle, 2011 ; Olivares et Uauy, 1996).



La CP est le principal transporteur sérique de cuivre dans l'organisme, liant jusqu'à 95 % du cuivre circulant (Waggoner, Bartnikas et Gitlin, 1999). La CP pourrait assurer ainsi l'apport en cuivre aux tissus de tout l'organisme, où il est utilisé dans la synthèse d'enzymes comme l'héphaestine, la cytochrome-C-oxydase, la lysyl-oxydase, la superoxyde-dismutase (SOD), la tyrosinase et la dopamine- $\beta$ -hydrolase et la CP elle-même (Frieden, 1986 ; Gambling, Kennedy et McArdle, 2011). Les événements menant à la livraison du cuivre par la CP demandent encore à être élucidés. Il a été montré, au moyen de la lignée cellulaire érythroleucémique K562, que la CP se lie à la membrane de ces cellules puis transfère les ions de cuivre à la suite d'une réduction qui faciliterait leur déchargement (Percival et Harris, 1991). Le cuivre, libéré de la CP, est par la suite retrouvé lié à la SOD dépendante de Cu-Zn, l'enzyme cytosolique la plus abondante des cellules K562. Il est à noter que la CP ne pénètre pas dans la cellule lors de son interaction pour livrer le cuivre, mais se dissocie de la membrane plasmique à la suite du transfert du cuivre, pour se retrouver dans le milieu extracellulaire (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). Il est à noter que des études faites sur des préparations tissulaires cardiaques et cérébrales ont consolidé le fait que la livraison du cuivre par la CP ne demande pas l'endocytose de la protéine (Orena, Goode et Linder, 1986). Il semblerait que seul le catabolisme de la CP au niveau du foie et qui mène à son élimination fasse appel à l'endocytose de la protéine (Omoto et Tavassoli, 1990).

Des résultats ont récemment suscité un doute sur l'existence d'un rôle de la CP comme livreur de cuivre. Ainsi, une étude a montré que l'inactivation du gène de la CP chez la souris ( $CP^{-/-}$ ) n'a pas perturbé l'absorption, le transport, la distribution et l'excrétion du cuivre dans l'organisme (Meyer *et al.*, 2001). Une corrélation existe entre ces résultats et ceux d'une étude nutritionnelle qui avait conclu que le transfert d'ions cuivriques par la CP serait trop lent pour attribuer à celle-ci un rôle d'instance dans le métabolisme du cuivre (Gitlin et Janeway, 1960). Enfin, il est rapporté qu'il n'existe aucune différence notable de l'excrétion biliaire du cuivre, la voie majeure d'élimination du cuivre, entre la souris knockout pour le gène de la CP et l'individu de type sauvage (Meyer *et al.*, 2001). Ces études questionnent donc le rôle que joue la CP dans le transport du cuivre et indiquent à tout le moins la nécessité d'études plus approfondies. Il reste plausible qu'en absence de CP, l'organisme développe un mécanisme compensatoire pour effectuer le transport du cuivre. À titre

d'exemple, l'albumine, protéine très abondante dans le plasma sanguin, agit comme transporteur de plusieurs types de métaux dont le cuivre.

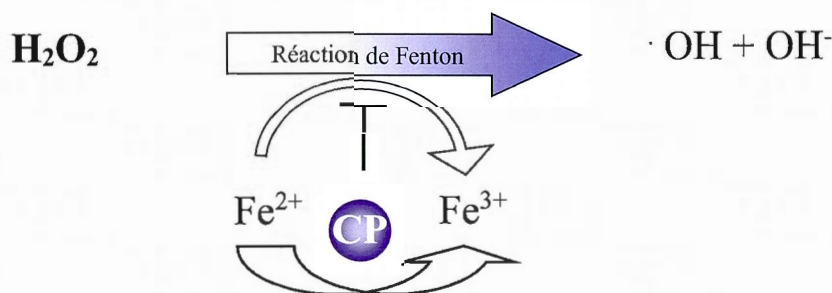
Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre la CP et certaines déficiences du métabolisme cuivrique, dont celles causées par la maladie de Wilson et la maladie de Menkes. La maladie de Wilson est causée par une mutation d'une ATPase de type P, l'ATP7B, responsable du transport du cuivre au niveau du Golgi. La mutation entraîne une diminution de l'incorporation du cuivre dans l'apoCP. Les ions cuivriques s'accumulent donc dans le cytoplasme des hépatocytes et favorisent notamment la production de radicaux libres oxygénés, provoquant des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides, et le développement d'une cirrhose du foie (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). De plus, on note aussi une accumulation anormale de cuivre dans des structures du cerveau (*e.g.* noyaux lenticulaires, noyaux gris sous-thalamiques). L'accumulation de cuivre dans le cerveau est étroitement associée à certaines maladies neurodégénératives (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). La maladie de Wilson est fortement corrélée avec une faible concentration sérique de CP fonctionnelle (Seo, 2006). La maladie de Menkes quant à elle est provoquée par la perte de fonction d'un autre transporteur de cuivre, l'ATP7A, dont la fonction est d'assurer l'efflux du cuivre du côté de la membrane basale des cellules intestinales. Normalement, le cuivre qui provient de la diète est capté au niveau de la membrane apicale des cellules intestinales puis largué du côté basal pour ensuite être distribué dans tout l'organisme. Une défectuosité de l'ATP7A provoque une accumulation du cuivre dans les cellules intestinales et une insuffisance en cuivre dans tout l'organisme (Kodama, Fujisawa et Bhadhprasit, 2012 ; Sarkar, 1999). Cette déficience en cuivre entraîne une perte d'activité des enzymes à cuivre, dont la CP (Kamolsilp, 2005). Des études suggèrent que des anomalies du métabolisme du cuivre puissent être impliquées dans le développement de certains troubles neurologiques tels la schizophrénie et le retard mental (Wolf, Kotun et Meador-Woodruff, 2006). Notons que la diminution de CP fonctionnelle qui découle d'une déficience en cuivre peut aussi contribuer à ces troubles.

#### 1.5.4 Propriétés antioxydantes

Les cellules fonctionnant selon un mode aérobie sont, en conditions normales, aptes à contrer les dommages provoqués par la présence d'espèces réactives oxygénées (ERO) (Chiu *et al.*) telles que les radicaux superoxydes ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), les radicaux hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ces ERO produites en excès lors d'un stress oxydatif, sont neutralisées par des enzymes spécialisées intracellulaires comme la SOD, la catalase et la glutathion-péroxydase (Gutteridge, 1983). Également, l'organisme dispose de molécules et enzymes antioxydantes extracellulaires (e.g. l'acide urique, la peroxirédoxine-4) pour contrer ou réduire les dommages dus au stress oxydatif tels la peroxydation des lipides membranaires et la mort cellulaire. L'activité antioxydante de la CP a été démontrée à plusieurs reprises, *in vitro* comme *ex vivo* (Aouffen *et al.*, 2001 ; Atanasiu *et al.*, 1998 ; Dumoulin *et al.*, 1996 ; Galdston *et al.*, 1984 ; Goldstein *et al.*, 1979 ; Stocks *et al.*, 1974). Elle serait même, selon certains auteurs, l'antioxydant le plus important contenu dans le sérum sanguin, jouant un rôle critique durant la réponse inflammatoire (Goldstein *et al.*, 1979 ; Stocks *et al.*, 1974).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer son rôle actif dans la prévention des dommages causés par le stress oxydatif. L'un de ces mécanismes implique une compétition entre l'activité ferroxidasique de la CP et la réaction de Fenton pour l'utilisation d'ions ferreux et leur conversion en ions ferriques (Gutteridge, 1985). La réaction de Fenton consiste en la génération de radicaux  $\cdot\text{OH}$  à partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  (fig. 1.4). En transformant le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ , la CP diminue le pool de  $\text{Fe}^{2+}$  et empêche ainsi la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Il est également proposé que l'activité oxydasique de la CP sur l'ion cuivreux puisse contribuer à l'action antioxydante de la CP (Healy et Tipton, 2007).

Un autre mécanisme de l'action antioxydante de la CP dépend de la capacité de piéger certaines ERO. Des études ont montré que la CP peut piéger les radicaux  $\cdot\text{O}_2^-$  en catalysant la dismutation du radical (Goldstein *et al.*, 1979). Dans des conditions physiologiques, la CP réagit seulement de manière stoechiométrique avec ce radical, i.e. qu'elle le lie sans transformation catalytique (Marklund, 1986). La CP peut également réagir avec le  $\text{H}_2\text{O}_2$  de manière stoechiométrique (Calabrese et Carbonaro, 1986) ou le transformer en molécule



**Figure 1.4 Diminution de la réaction de Fenton par l'action de la CP.** En transformant le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ , la CP diminue le pool de  $\text{Fe}^{2+}$  et empêche ainsi la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

d'eau en présence de glutathion (Cha et Kim, 1999 ; Kim et Park, 1998 ; Paradis *et al.*, 2010 ; Park *et al.*, 1999). Il a été montré que la CP provoque la terminaison de chaînes de réactions radicalaires pour une variété de radicaux libres oxygénés (Atanasiu *et al.*, 1998).

Différentes études ont mis en évidence le rôle protecteur de la CP dans divers tissus ou cellules exposés à des conditions de stress oxydatif. La CP protège le cœur isolé contre les radicaux libres produits par électrolyse du tampon de perfusion (Chahine *et al.*, 1991 ; Mateescu *et al.*, 1995) ou par une ischémie-reperfusion (Atanasiu *et al.*, 1995 ; Dumoulin *et al.*, 1996), prévient les dommages causés par la reperfusion lors de transplantation rénale (Baron *et al.*, 1991) et inhibe l'oxydation des lipides de préparations de membranes cellulaires ou de vésicules artificielles (Al-Timimi et Dormandy, 1977 ; Goldstein *et al.*, 1979 ; Yamashoji et Kajimoto, 1983). Il est suggéré que la CP joue un rôle prépondérant comme mécanisme de défense dans le tissu pulmonaire à la suite d'une hyperoxie, la présence d'ARNm de la CP étant particulièrement augmentée dans cette condition (Fleming, Whitman et Gitlin, 1991). Il est rapporté que la CP prévient, de par son activité antioxydante, l'endommagement de protéines et de l'ADN et protège les cellules de la lyse souvent induite par les radicaux libres (Fox, Mukhopadhyay et Ehrenwald, 1995). Par contre, des études effectuées par l'équipe de Fox (1995) indiquent que la CP peut aussi stimuler l'oxydation de lipides membranaires, possiblement par le relâchement de ses ions de cuivre lesquels alimenteraient la réaction de Fenton. Un équilibre entre les actions antioxydantes et pro-oxydantes de la CP pourrait dépendre de son intégrité structurale (Fox, Mukhopadhyay et

Ehrenwald, 1995 ; Mukhopadhyay *et al.*, 1997). À ce jour, les impacts physiologiques des activités à la fois anti- et pro-oxydantes attribuées à la CP, de même que les circonstances dans lesquelles l'une ou l'autre de ces activités est favorisée, demandent à être éclaircis, notamment en ce qui a trait à la réponse inflammatoire (Healy et Tipton, 2007 ; Marques *et al.*, 2012).

### 1.5.5 Protéine de phase aiguë

La CP est considérée comme une protéine de phase aiguë puisque sa concentration augmente deux à trois fois durant les premiers stades de l'inflammation ou d'une infection (Cousins, 1985 ; Healy et Tipton, 2007). Ses propriétés antioxydantes et son activité ferroxidasique, de même que sa capacité de transporter le cuivre suggèrent un rôle de protection lors de la réponse inflammatoire (Marques *et al.*, 2012). Ainsi, la CP peut d'une part piéger et neutraliser les ERO produites par les neutrophiles et les macrophages pour éviter la production de dérivés plus toxiques (Cousins, 1985). D'autre part, la CP, de par son activité ferroxidasique, diminue la formation de  $\cdot\text{OH}$ . Elle peut aussi transférer le fer à la transferrine (Tf), ce qui contribue à l'élimination de cet élément du site d'inflammation et donc, diminue le risque de formation de ERO (Mazumder *et al.*, 1997). Finalement, comme le cuivre possède des propriétés anti-inflammatoires, il est possible que la CP puisse participer à la réponse de phase aiguë en approvisionnant la région lésée en cuivre (Berthon, 1993 ; Jackson *et al.*, 2000).

### 1.5.6 Rôle dans l'angiogenèse

Des études ont montré que, contrairement à l'apoCP (dépourvue de cuivre), la CP native, ses fragments contenant du cuivre, des sels de cuivre ou d'autres molécules capables de complexer le cuivre, ont des propriétés pro-angiogéniques (McAuslan et Reilly, 1980 ; Raju *et al.*, 1982). Des propriétés pro-angiogéniques du cuivre ont été mises en évidence au début des années 1980 par des études qui ont montré que les ions de cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Cu}^+$ , utilisés à une concentration de  $10^{-6}$  M, induisent la migration de cellules endothéliales de l'aorte bovine (Alessandri, Raju et Gullino, 1983 ; McAuslan *et al.*, 1983). Jusqu'à ce jour, les mécanismes de l'induction de la migration cellulaire par le cuivre ne sont pas bien élucidés (Lowndes et



Harris, 2004). Toutefois, il est reconnu que l'augmentation de la concentration cuivrique dans le sérum est corrélée avec une activation de facteurs pro-angiogéniques tels le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance fibroblastique basique (BFGF), le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 (Nasulewicz, Mazur et Opolski, 2004). Le rôle possible de la CP dans le processus d'angiogénèse proviendrait du fait que la protéine renferme des atomes de cuivre dans sa structure (Raju *et al.*, 1982). Des études ont montré que la concentration sérique de la CP augmente en présence de tumeurs autant chez l'homme que chez les animaux (Linder *et al.*, 1979 ; Ungar-Waron *et al.*, 1978). Précisément, les niveaux d'ARNm de la CP est trois fois plus élevé dans les lignées de cellules cancéreuses du foie comparativement aux cellules saines (Kunapuli *et al.*, 1987), possiblement en relation avec le fait que les cellules tumorales stimulent une angiogénèse pour assurer leur survie.

#### 1.5.7 Régulateur du métabolisme du fer

Le fer est un élément essentiel à une multitude de processus biologiques notamment en tant que cofacteur de plusieurs enzymes comme les cytochromes de la chaîne de transport d'électrons, ou la ribonucléotide-réductase qui contrôle la production de déoxyribonucléotides durant la synthèse de l'ADN, ainsi que pour d'autres enzymes impliquées dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes et de neurotransmetteurs tels la dopamine et la sérotonine (Gambling, Kennedy et McArdle, 2011). Or, des quantités excessives d'ions de fer peuvent être irrémédiablement dommageables pour les cellules. Des accumulations de fer sont associées à certaines maladies neurodégénératives, au vieillissement, à l'athérosclérose, au cancer et à diverses infections microbiennes (Mukhopadhyay, Attieh et Fox, 1998 ; Texel, Xu et Harris, 2008). Conséquemment, les cellules sont dotées de mécanismes finement régulés qui permettent de contrôler les niveaux de fer. À cet égard, plusieurs protéines et enzymes sont sollicitées dans la mobilisation, le transport et la séquestration du fer dans l'organisme (de Silva, Askwith et Kaplan, 1996 ; Kaplan et O'Halloran, 1996). La CP fait partie de ces intervenants majeurs de l'homéostasie du fer (Qian et Ke, 2001). Comme nous allons le voir, la régulation du métabolisme du fer est le rôle le mieux documenté de la CP et considéré le plus important jusqu'à maintenant. La CP régirait l'efflux du fer par les cellules de même que l'influx dépendant de la Tf et l'influx indépendant de la Tf.

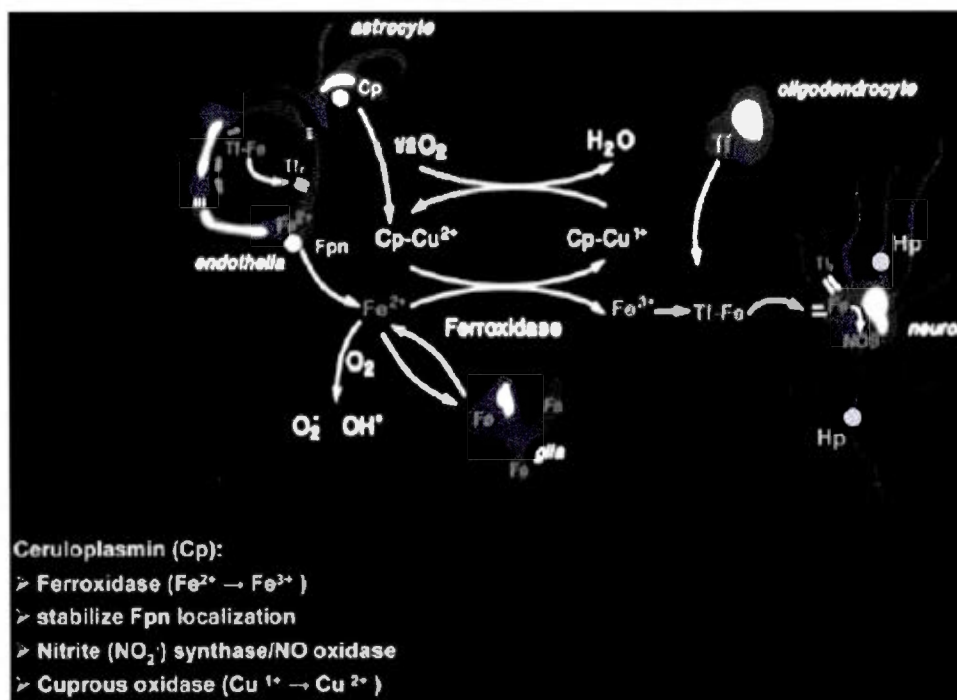
Il est connu aujourd'hui que lorsque la CP oxyde le fer, elle en favorise du même coup son incorporation dans l'apo-Tf, une protéine-chaperon capable de lier et transporter deux ions ferriques (Qian et Ke, 2001 ; Texel, Xu et Harris, 2008). Or, ce concept et sa pertinence dans le métabolisme du fer a mis du temps à être validé et accepté. Il était clairement reconnu dès les années 1960 que la CP possède une activité ferroxidasique (Curzon, 1961), sans toutefois extrapoler cette activité catalytique à un rôle clé dans le métabolisme du fer. C'est dans une publication datant de 1966 que trois chercheurs ont identifié pour la première fois la signification physiologique de l'oxydation du fer par la CP (Osaki, Johnson et Frieden, 1966). De par son activité ferroxidasique, la CP augmente l'incorporation d'ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans la Tf via un mécanisme consommant de l'oxygène de manière stoechiométrique, ce qui résulte en une augmentation de la biodisponibilité du fer pour les cellules (Osaki, Johnson et Frieden, 1966). Ces résultats suggérant une implication de la CP dans le métabolisme du fer ont pourtant suscité à l'époque une grande controverse dans le milieu scientifique. L'auto-oxydation rapide du  $\text{Fe}^{2+}$ , l'incapacité - croyait-on à tort - du  $\text{Fe}^{3+}$  à se lier à l'apo-Tf (Bates, Workman et Schlabach, 1973), le métabolisme normal du fer malgré un faible taux de CP chez les patients souffrant de la maladie de Wilson étaient les arguments avancés à l'époque en défaveur d'un rôle important de la CP dans le métabolisme du fer (Roeser *et al.*, 1970). Depuis, différentes études ont permis de confirmer le rôle prépondérant de la CP dans l'homéostasie du fer (Ke *et al.*, 2006 ; Texel, Xu et Harris, 2008 ; Wolf, Kotun et Meador-Woodruff, 2006 ; Xu *et al.*, 2004).

Il existe une littérature bien documentée sur la Tf et son rôle de pourvoyeur de fer pour les cellules. La Tf est synthétisée et sécrétée par les cellules hépatiques, les cellules de Sertoli, ainsi que par les oligodendrocytes dans le cerveau (Texel, Xu et Harris, 2008). La voie d'entrée du fer dépendante de la Tf implique un système retrouvé notamment au niveau des précurseurs érythroïdes mais aussi décrit dans le système nerveux central (SNC) (de Silva, Askwith et Kaplan, 1996 ; Texel, Xu et Harris, 2008). Dans ce mécanisme, la Tf diferrique, associée à son récepteur membranaire localisé dans les puits recouverts de clathrine, est d'abord endocytosée par la cellule, où elle relâche son contenu en fer, pour ensuite être recyclée vers la membrane plasmique avec son récepteur. Il est à noter que le récepteur membranaire de la Tf est abondamment exprimé dans le SNC, notamment sur les



neurones. Considérant que la CP est aussi exprimée dans le cerveau (à la surface des astrocytes) sous forme CP-GPI, il apparaît donc plausible de penser que celle-ci puisse être impliquée dans les mécanismes d'entrée de fer, via la Tf, dans les neurones (fig. 1.5) (Marques *et al.*, 2012 ; Texel, Xu et Harris, 2008). En d'autres termes, la CP et la Tf ont toutes deux des sites d'expression à proximité, un contexte favorable qui offre la possibilité à ces deux protéines d'avoir des actions commune et/ou complémentaire dans le métabolisme du fer. Par son activité ferroxidasique, la CP peut catalyser l'oxydation de l'ion  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ , permettant ainsi à deux ions ferriques d'être incorporés dans la Tf pour ensuite être acheminés dans la cellule selon le mécanisme décrit précédemment. Ainsi, en contribuant à l'incorporation du fer dans la Tf, la CP participe indirectement à l'assimilation du fer par la voie dépendante de la Tf et de son récepteur (Texel, Xu et Harris, 2008). À cet égard, il est important de souligner qu'il a été montré que la CP ne se lie pas directement à la Tf (Texel, Xu et Harris, 2008).

D'autre part, la CP peut également être impliquée dans l'efflux de fer des cellules. Une étude a montré que la CP-GPI exprimée à la surface des astrocytes co-localise avec un transporteur d'ions métalliques divalent IREG1. Ce transporteur est connu sous le nom de ferroportine (Fpn) et a pour fonction de permettre l'exportation du fer, emmagasiné dans la cellule par la ferritine, vers l'extérieur de la cellule (fig. 1.5) (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). En plus d'être exprimée par les astrocytes, la Fpn est retrouvée sur les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, les neurones et les oligodendrocytes (Texel, Xu et Harris, 2008). Il a été montré à partir de cellules astrocytaires que ce transporteur est incapable d'assurer l'efflux de fer en absence de CP-GPI ou de CP soluble (Jeong et David, 2003). Plus récemment, il a été montré que l'activité ferroxidasique de la CP est nécessaire pour maintenir la stabilité de l'expression de la Fpn à la surface cellulaire et ainsi assurer son action d'exportateur de fer. En absence de CP, ce transporteur est rapidement internalisé pour être dégradé, suggérant un nouveau mode d'action de la CP dans le métabolisme du fer (De Domenico *et al.*, 2007). Une observation importante appuie aussi cette ligne de pensée. Les personnes souffrant d'acéruoplasminémie, une déficience héréditaire en CP, montrent un faible niveau de fer dans le sérum, corrélé à une accumulation de cet ion dans certains organes dont le foie et le cerveau (Harris *et al.*, 1995 ; Kono, 2012).

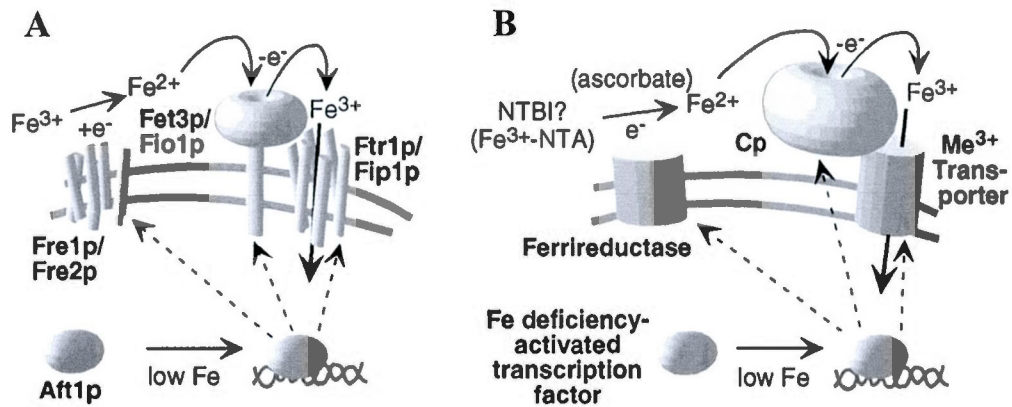


**Figure 1.5 Rôle de la CP dans le métabolisme du fer dans le SNC.** La CP localisée à la surface des astrocytes peut catalyser l'oxydation de l'ion  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ , et permettre ainsi à deux ions ferriques d'être incorporés dans la transferrine (Tf), un transporteur de fer sécrété par les oligodendrocytes. La Tf diferrique se lie à son récepteur membranaire sur les neurones pour être endocytosée par la cellule, où elle relâche son contenu en fer. La Tf sera ensuite recyclée vers la membrane plasmique avec son récepteur. Le récepteur membranaire de la Tf est abondamment exprimé dans le SNC, notamment sur les neurones. La CP peut également favoriser la stabilisation de la ferroportine (Fpn), un récepteur membranaire exprimé par les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes et qui est impliqué dans les efflux de fer, permettant ainsi la sortie de fer de la cellule. L'héphaestine (Hp), une protéine homologue à la CP, pourrait participer à l'homéostasie du fer dans le cerveau. Figure tirée de Texel, Xu et Harris (2008).

Une étude a par la suite montré, à partir de souris  $\text{CP}^{-/-}$ , que l'accumulation de fer dans ces organes est causée par une altération de la sortie de fer des cellules, et non par des problèmes d'absorption de fer par l'organisme ou encore par des problèmes d'entrée de fer dans les cellules (Harris *et al.*, 1999). Ainsi, la CP joue bien un rôle physiologique essentiel dans la régulation de la libération du fer dans certains types cellulaires.

La CP est capable d'augmenter l'internalisation du fer dans des cellules qui ne produisent pas la Tf, notamment dans le cas des cellules obtenues à partir de patients atteints d'hémochromatose, une maladie héréditaire qui entraîne des défauts d'absorption de fer dans les cellules. Ces études suggèrent qu'il existe une voie indépendante de la Tf qui permet l'internalisation du fer (Mukhopadhyay, Attieh et Fox, 1998). Le fonctionnement de cette voie n'est pas encore bien compris, mais il pourrait ressembler à celui qui a été élucidé chez la levure. Dans cet organisme, le mécanisme (fig. 1.6A) fait intervenir une ferriréductase transmembranaire (Fre1p/2p), une ferroxidase transmembranaire (Fet3p) et un transporteur de  $\text{Fe}^{3+}$  transmembranaire (Ftr1) dont les structures géniques ont été élucidées (Attieh *et al.*, 1999). Des travaux ont révélé une homologie de séquence entre Fet3p et la CP (Askwith et Kaplan, 1997 ; de Silva *et al.*, 1997 ; De Silva *et al.*, 1995). Fet3p est une protéine à cuivre de haut poids moléculaire (100-120 kDa) et tout comme la CP, catalyse l'oxydation des ions ferreux (de Silva *et al.*, 1997). Il a été montré que Fet3p peut aussi oxyder le  $\text{Cu}^{1+}$  en  $\text{Cu}^{2+}$ , ce qui ferait également de cette oxydase un régulateur de l'homéostasie du cuivre chez la levure (Shi *et al.*, 2003). Au niveau de sa structure, Fet3p possède un segment transmembranaire, contrairement à la CP qui est non membranaire (Dancis *et al.*, 1992 ; Kaplan et O'Halloran, 1996 ; Stearman *et al.*, 1996). En raison de la ressemblance existant entre Fet3p et la CP, un modèle de l'entrée du fer dans les cellules de mammifères a été proposé. Ce modèle (fig. 1.6B) implique, en plus de la CP, une ferriréductase et un transporteur d'ions  $\text{Me}^{3+}$  qui demeurent encore hypothétiques.

Une étude fait mention d'une augmentation de l'entrée de  $^{55}\text{Fe}$  dans les cellules hépatiques HepG2 déficientes en fer via l'action de la CP et ce, selon un mécanisme indépendant de la Tf (De Silva *et al.*, 1995 ; Mukhopadhyay, Attieh et Fox, 1998). Elle fait également mention que la privation de fer entraîne, au niveau de la transcription, la biosynthèse de CP par les hépatocytes HepG2 de même que la synthèse de Fep3 par *S. cerevisiae*. Il a été montré que la CP peut stimuler l'entrée de fer dans les cellules érythroleucémiques K562 par un mécanisme impliquant un transporteur spécifique de cations trivalents (Attieh *et al.*, 1999).



**Figure 1.6** Représentation du mécanisme d'entrée du fer indépendant de la Tf pour la levure et les cellules de mammifères. **A** Entrée de fer dans *S. cerevisiae* et *S. pombe*. Selon ce modèle, la ferrireductase Fre1p/Fre2p initie l'entrée de fer en convertissant le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  au niveau extracellulaire. Le fer réduit est immédiatement réoxydé en  $\text{Fe}^{3+}$  par Fet3p/Fio1p, une ferroxidase semblable à la CP. Le  $\text{Fe}^{3+}$  est transporté au niveau intracellulaire par Ftr1p (ou Fip1p), un transporteur à six segments transmembranaires qui interagit avec Fet3p (ou Fio1p). **B** Entrée de fer stimulée par la CP dans les cellules de mammifères. Ce mécanisme impliquerait une ferrireductase et un transporteur de cations spécifique aux  $\text{Me}^{3+}$  qui demeurent à être identifiés. La ferroxidase chez les mammifères est la CP, une enzyme sécrétée, contrairement à Fet3p (Fio1p) qui est membranaire. Comme chez la levure, une déficience en fer stimulerait la transcription de la ferrireductase, de la ferroxidase et du transporteur de  $\text{Me}^{3+}$ . Tirée de Attieh *et al.* (1999).

Tout comme dans le cas de la Tf, la CP peut également favoriser l'incorporation de fer dans la ferritine (Juan et Aust, 1998). La ferritine est une protéine intracellulaire d'environ 500 kDa, composée de deux chaînes protéiques nommées H et L. Elle est responsable de l'entreposage du fer au niveau intracellulaire, sous une forme non toxique pour la cellule. La quasi totalité du fer entreposé dans la cellule est sous forme d'ions ferriques dans la ferritine (Texel, Xu et Harris, 2008). Toutefois, le mécanisme par lequel la CP charge le fer dans la ferritine demeure encore nébuleux. *In vitro*, la chaîne H de la ferritine peut interagir avec la CP et stimuler son activité ferroxidasique (Van Eden et Aust, 2000). L'ion ferrique peut dès lors être incorporé dans la ferritine via les quatre hélices  $\alpha_2$  de la chaîne H (Juan et Aust, 1998). Ce processus est répété jusqu'à ce que la ferritine soit totalement chargée en ions ferriques (Van Eden et Aust, 2000). Toutefois, notons que ces études ont été effectuées dans un modèle acellulaire où la CP et la ferritine n'étaient pas séparées par une membrane plasmique, comme c'est le cas physiologiquement (Van Eden et Aust, 2000).

En 1987, des chercheurs ont caractérisé une maladie autosomale récessive héréditaire dont certains des symptômes étaient très ressemblants à ceux de la maladie de Parkinson (*e.g.* dysarthrie, dystonie, ataxie et démence légère). Les différents symptômes tels que le diabète sucré, la dégénérescence de la rétine, la neurodégénération avec blépharospasme, ont été corrélés à une absence de CP (Miyajima *et al.*, 1987 ; Xu *et al.*, 2004). Des analyses génétiques ont montré qu'il existe près d'une vingtaine de mutations spécifiques dans le gène de la CP, lesquelles entraînent, dans tous les cas, la terminaison prématurée de la transcription de l'ARNm de la CP. La protéine résultante est tronquée de sa portion C-terminale et est irréversiblement non-fonctionnelle (Hellman et Gitlin, 2002). De plus, les symptômes énumérés plus haut étaient accompagnés d'accumulations excessives de fer dans le pancréas, la rétine et le cerveau. La nouvelle maladie a ainsi été baptisée du nom d'acéruloplasminémie, et sa découverte a contribué de façon majeure à la compréhension de l'importance physiologique de la CP dans le métabolisme du fer dans l'organisme (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005 ; Xu *et al.*, 2004). Dans le cerveau, la vision retenue actuellement veut qu'en absence de CP les ions ferreux s'accumulent dans les cellules du parenchyme cérébral (*i.e.* les neurones), provoquant des dommages spécifiques aux neurones, et entraînent aussi la perte de facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales essentiels pour la survie neuronale (Harris *et al.*, 1999). Des résultats ont montré que l'accumulation de fer dans les organes des souris  $CP^{-/-}$  est due à une altération de la sortie du fer cellulaire (Harris *et al.*, 1999).

### 1.5.8 Autres actions de la CP

Au cours des deux dernières décennies, différentes études ont soulevé la possibilité d'autres fonctions de la CP. Ainsi, elle agirait notamment sur des canaux à potassium pour induire une dépolarisation membranaire de cellules de neuroblastome (Wang *et al.*, 1995). Une étude a montré une action de la CP sur la durée de la période réfractaire du cœur isolé et suggéré que cette action pouvait passer par des canaux potassiques (Atanasiu *et al.*, 1996). D'autres études indiquent que la CP possède une activité NO-oxydase qui, couplée à son activité de S-nitrosylation, permet de nitrosyler de petits composés thiols comme le glutathion ou encore des résidus de cystéine (Inoue *et al.*, 1999 ; Mani *et al.*, 2004). Il est proposé que le mécanisme de la réaction passe par la formation d'un intermédiaire  $NO^{+}$



(Shiva *et al.*, 2006). La CP posséderait également une activité GSH-péroxydase en présence de  $H_2O_2$  (Kim et Park, 1998). Il avait été suggéré que les activités NO-oxydase et GSH-péroxydase attribuées à la CP pouvaient lui conférer des propriétés cytoprotectrices *in vivo* contre les dommages induits par le stress oxydatif (Park *et al.*, 1999). Une telle protection a été mise en évidence dans les cultures de cardiomyocytes exposées au  $H_2O_2$  (Paradis *et al.*, 2010).

Une étude de l'équipe du Dre Paquin, parue en 2003, a montré que la CP a une action agrégative sur des cultures de neurones nouvellement différenciés de cellules embryonnaires P19 (Maltais *et al.*, 2003), ce qui pourrait indiquer un rôle dans le développement du système nerveux, possiblement en relation avec la neuromigration (voir section 2.4). Les mécanismes de l'action neuroagrégative et sa signification biologique ne sont pas connus et sont le sujet de recherche des travaux de la présente thèse.

### 1.5.9 L'héphaestine, protéine homologue de la CP

Outre la CP qui participe à l'homéostasie du fer dans l'organisme, il existe une autre protéine cuivrique qui joue un rôle essentiel dans la régulation du transport du fer dans l'organisme : l'héphaestine. Il s'agit d'une protéine transmembranaire qui présente un haut degré d'homologie avec la CP. Précisément, les résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison des atomes de cuivre de même que les ponts disulfures de la CP sont conservés dans la structure de l'héphaestine (Anderson *et al.*, 2002). Tout comme la CP, l'héphaestine possède une activité ferroxidasique (Petrak et Vyoral, 2005 ; Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). Cette protéine est exprimée à la membrane basale des cellules de la paroi gastro-intestinale et participe à l'efflux basolatéral du fer (de concert avec la Fpn) précisément en catalysant l'oxydation du  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  du côté extracellulaire de la membrane. Le  $Fe^{3+}$  est ensuite incorporé dans l'apo-Tf pour ensuite être redistribué dans tout l'organisme via la circulation sanguine (Petrak et Vyoral, 2005). Il a été montré que l'expression de l'héphaestine augmente dans le duodénum chez les gens qui présentent une déficience en fer (Zoller *et al.*, 2003). Soulignons qu'il a été montré que l'héphaestine est également exprimée (ARNm et protéine) dans certaines régions du SNC en développement (*e.g.* le cortex, l'hippocampe, le striatum et la substance noire), supportant l'idée d'un rôle possible de



l'héphaestine dans le métabolisme du fer dans le cerveau (Qian *et al.*, 2007). À ce jour, on ne rapporte pas de maladies humaines en lien avec l'héphaestine.

### 1.6 Protéines de liaison de la CP

C'est au tournant des années 1980 que les chercheurs ont commencé à s'intéresser à l'existence possible de récepteurs spécifiques de la CP, leur distribution et leur signification biologique. C'est Frieden qui le premier postula la présence d'un récepteur spécifique de la CP à la membrane plasmique (Frieden, 1980). La majorité des études entreprises sur les récepteurs de la CP ont utilisé des analyses de liaison avec de la CP marquée ou ont réalisé une caractérisation structurale partielle en combinant chromatographie d'affinité (ou réticulation croisée) et électrophorèse.

Le tableau 1.1 résume les résultats d'études de liaison. Des sites de liaison spécifiques ont été observés dans des extraits membranaires de tissus aortique et cardiaque de poulet ainsi que de foie et de cerveau. Des études additionnelles ont permis de montrer que des récepteurs de la CP étaient également présents dans les cellules sanguines incluant les érythrocytes, les monocytes, les granulocytes et les lymphocytes. L'existence de sites de liaison a été également montrée au niveau des cellules endothéliales hépatiques et de fibroblastes HT-1080. Il ressort de l'ensemble de ces études de liaison des valeurs de constante de dissociation ( $K_d$ ) variant de 1 nM à 500 nM. La détermination du nombre de sites de liaison varie aussi d'une étude à l'autre. Par exemple, le nombre de sites de liaison est beaucoup moins élevé sur les érythrocytes, comparativement à ceux retrouvés sur les cellules endothéliales du foie ou sur des fibroblastes. Il semble que le nombre de sites est moins élevé pour les cellules qui n'internaliseraient pas la CP. D'autre part, on note un nombre de sites de liaison près de 5 fois moins élevé dans le tissu aortique, comparativement au tissu cardiaque. Enfin, la CP serait internalisée par les cellules endothéliales hépatiques, les fibroblastes et les cellules circulantes autres que les érythrocytes. Il est à noter que l'internalisation de la CP par le récepteur endothélial du foie est le mécanisme par lequel la CP est éliminée de la circulation (Omoto et Tavassoli, 1990).

De tous les récepteurs potentiels de la CP, c'est à ce jour le récepteur érythrocytaire qui demeure le plus documenté. Des études portant sur le récepteur érythrocytaire ont montré que la liaison de la CP n'induit pas son internalisation dans la cellule (Saenko, Skorobogat'ko et Yaropolov, 1990). Cette interaction a la particularité d'être dépendante de la présence d'ions calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Saenko, Basevich et Iaropolov, 1988). Il a été proposé que ce récepteur soit une glycoprotéine membranaire abondamment exprimée par les érythrocytes, la glycophorine laquelle existerait sous formes monomérique de 30 kDa et dimérique de 60 kDa (Saenko, Skorobogat'ko et Yaropolov, 1990 ; Stern et Frieden, 1993). Il semble que la présence de résidus d'acide sialique dans la structure de la CP soit importante pour la liaison de cette dernière avec les résidus glucidiques de la glycophorine (Saenko, Skorobogat'ko et Yaropolov, 1990). Finalement, une étude par immunocytofluorescence avec de la CP marquée d'un fluorophore a montré que la liaison de la CP au récepteur érythrocytaire est saturable, réversible et spécifique (Stern et Frieden, 1990).

Les travaux portant sur le récepteur fibroblastique ont montré que le complexe formé de la CP et de son récepteur à la surface des fibroblastes est internalisé par la cellule (Puchkova *et al.*, 1997). Il s'en suit un largage dans le milieu extracellulaire de deux espèces protéiques, l'une étant la CP dépourvue de ses atomes de cuivre (apoCP), l'autre correspondant à la forme native de la CP dénudée en acide sialique. Dû à la perte de ses acides sialiques, la CP n'est plus apte à interagir avec le récepteur fibroblastique. Il est intéressant de noter que la CP native ne peut se lier à des cellules HepG2, une lignée cellulaire d'hépatoblastome humain. Toutefois, ces mêmes cellules possèdent à leur surface des récepteurs d'asialoglycoprotéine qui permettent de reconnaître puis de lier la CP sous forme asialo. En somme, la CP se lie au récepteur fibroblastique et/ou endothélial, puis est internalisée cellulièrement. Pendant son transit vésiculaire dans les cellules, les résidus d'acide sialique sont éliminés de la CP qui conserve ses atomes de cuivre. La forme asialoCP résultante qui est sécrétée hors de la cellule pourrait dès lors être prise en charge par les récepteurs des asialoglycoprotéines présents à la surface des hépatocytes (Puchkova *et al.*, 1997). Des études plus approfondies sur le récepteur fibroblastique de la CP ont fait mention qu'il n'est pas entreposé dans le trans-Golgi, mais plutôt apparaît à la surface cellulaire suite à sa maturation (Sasina, Puchkova et Gaitskhoki, 1998). De plus, ce récepteur membranaire est, suite à

l'internalisation du complexe CP-récepteur, recyclé dans les endosomes. Enfin, l'interaction du récepteur fibroblastique avec la CP requiert un clivage protéolytique spécifique du récepteur, clivage qui peut être inhibé par des inhibiteurs de protéases à sérine (Sasina, Puchkova et Gaitskhoki, 1998).

Certaines équipes de recherche ont tenté de purifier et caractériser structuralement les récepteurs de la CP, majoritairement par chromatographie d'affinité sur de la CP réticulée à de l'agarose (CP-agarose). Les résultats de ces études sont résumés dans le tableau 1.2. Il apparaît de ces études que le poids moléculaire du récepteur varie de 20 à 130 kDa. Dans certains cas, le profil électrophorétique montre une bande unique, dans d'autres cas, jusqu'à trois bandes. On ne sait pas si les bandes multiples indiquent l'existence de différents récepteurs, d'un récepteur constitué de différents polypeptides ou d'un polypeptide qui aurait été fragmenté pendant la purification. Il a été montré que le récepteur endothélial du foie a un point isoélectrique (pI) de 5,2 ainsi qu'une teneur en glucides de 3 % (Omoto et Tavassoli, 1990).

Récemment, une équipe a rapporté avoir cloné puis caractérisé partiellement un récepteur humain de la CP (Sasina *et al.*, 2000). À partir d'une banque d'ADNc d'origine placentaire humaine, ils ont effectué un criblage de cette banque au moyen d'un anticorps produit contre le récepteur potentiel de la CP, récepteur purifié par chromatographie sur CP-agarose. Ils ont isolé une séquence de 2300 pb (paires de base) codant vraisemblablement pour un fragment du récepteur humain de la CP. Cette séquence renferme plusieurs régions ayant une forte homologie avec le gène de la CP (Sasina *et al.*, 2000). La traduction et l'analyse informatique de cette séquence révèle un polypeptide présentant plusieurs similitudes avec la CP, notamment la présence de sites de glycosylation ainsi qu'une homologie de la séquence N-terminale. De plus, la position de certains acides aminés (His 295 et 343, Cys 338 et Leu 348) du récepteur est compatible avec la formation d'un domaine de liaison pour le Cu. Or, cette séquence homologue se retrouve dans le domaine 2 de la CP et est impliquée dans les propriétés ferroxidasiques de la protéine. Il a été suggéré que ce récepteur humain de la CP puisse présenter des propriétés ferroxidasiques similaires à celle de la CP. Enfin, cette séquence peptidique décrit une glycoprotéine comportant une région hydrophobe de 16

acides aminés en position C-terminale (C-t) qui pourrait correspondre à un domaine transmembranaire (Sasina *et al.*, 2000). Il n'y a pas eu de suite à ces études et une séquence ADN complète d'un récepteur placentaire de la CP n'a pas été publiée. Ce récepteur demeure donc non caractérisé.

À l'heure actuelle, il n'y a que spéculation sur l'impact biologique de récepteurs de la CP. Il a été postulé que la liaison de la CP aux récepteurs érythrocytaires, aortiques et cardiaques, pourrait contribuer à protéger les cellules contre le stress oxydatif (Barnes et Frieden, 1984 ; Stevens, DiSilvestro et Harris, 1984). La protection pourrait même être étendue aux monocytes, granulocytes et lymphocytes, considérant que les leucocytes sont capables de produire des anions superoxydes pour fins de défense de l'organisme (Kataoka et Tavassoli, 1985). Il a également été proposé que la présence des récepteurs puisse contribuer à la synthèse de nouvelles protéines en assurant le transport des ions cuivriques, essentiels à la biosynthèse de certaines protéines, de la CP vers les cellules cibles.

En résumé, il y a plus de 20 années, plusieurs études ont tenté d'isoler et caractériser des récepteurs spécifiques de la CP. Les résultats n'ont pas généré de connaissances précises sur la structure de tels récepteurs. L'existence de récepteurs neuronaux de la CP a été soulevée plus récemment par les travaux du Dr Samuel David à partir de tranches de cervelet mises en culture. Son équipe a montré que l'interaction neurone-neurone et neurone-astrocyte peut être perturbée en présence d'un anticorps, le Mab1A1. Il a été montré aussi que cet anticorps a pour cible spécifique la CP (Mittal et David, 1994b, 1994a). Ainsi, en se complexant à la CP exprimée à la surface des cellules gliales, l'anticorps inhibe l'adhésion des neurones aux cellules gliales. De plus, il a été montré *in vitro* que la migration des neurones sur les cellules gliales est considérablement réduite en présence de l'anticorps anti-CP sur les cultures (Mittal et David, 1994b). Ces résultats permettent d'entrevoir la possibilité que la CP puisse interagir avec les neurones via la présence d'un récepteur membranaire. Plus près de nous, les équipes des Drs Paquin et Mateescu ont montré que l'action agrégative de la CP sur des neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaire P19 pourrait dépendre d'une liaison de la CP à un récepteur neuronal (voir section 4.2) (Maltais *et al.*, 2003). Il est à souligner que du côté neuronal également, on connaît peu de choses sur les récepteurs de la

CP. L'ensemble de toutes les études justifie ainsi l'intérêt de poursuivre les recherches déjà entreprises visant à améliorer notre compréhension des récepteurs de la CP et de leurs fonctions biologiques.



**Tableau 1.1 Résumé d'études de liaison pour la CP\***

Matériel biologique	Marquage de la CP	K <sub>d</sub> (M)	Nombre de sites	Internalisation de la CP	Référence
Fraction membranaire					
- tissu aortique	<sup>125</sup> I-CP	10 <sup>-8</sup>	1,5 pmol/mg prot. memb.	non	(Stevens, DiSilvestro et Harris, 1984)
- tissu cardiaque	<sup>125</sup> I-CP <sup>67</sup> Cu-CP	10 <sup>-8</sup> 10 <sup>-7</sup>	7,3 pmol/mg prot. memb.	non	(Stevens, DiSilvestro et Harris, 1984)
- tissu de foie	<sup>67</sup> Cu-CP	10 <sup>-7</sup>			(Orena, Goode et Linder, 1986)
- tissu de cerveau	<sup>67</sup> Cu-CP	10 <sup>-7</sup>			(Orena, Goode et Linder, 1986)
Érythrocytes					
- humains	<sup>125</sup> I-CP <sup>125</sup> I-CP	5,0 x 10 <sup>-9</sup> 1,2 x 10 <sup>-9</sup>	144/cellule 246/cellule	non non	(Barnes et Frieden, 1984) (Saenko <i>et al.</i> , 1988, 1990; Saenko et Yaropolov, 1990)
- de lapin	<sup>125</sup> I-CP	4,0 x 10 <sup>-9</sup>	294/cellule	non	(Barnes et Frieden, 1984)
Monocytes humains	<sup>125</sup> I-CP	4,8 x 10 <sup>-7</sup>		oui	(Kataoka et Tavassoli, 1985)
Granulocytes humains	<sup>125</sup> I-CP	1,6 x 10 <sup>-7</sup>		oui	(Kataoka et Tavassoli, 1985)
Lymphocytes humains	<sup>125</sup> I-CP	2,1 x 10 <sup>-7</sup>		oui	(Kataoka et Tavassoli, 1985)
Cellules endothéliales de foie	<sup>125</sup> I-CP	10 <sup>-7</sup>	5,7 x 10 <sup>5</sup> /cellule	oui	(Kataoka et Tavassoli, 1984)
Fibroblastes humains (lignée HT-1080)	<sup>125</sup> I-CP	8,0 x 10 <sup>-8</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup> /cellule	oui	(Puchkova <i>et al.</i> , 1997)

\* Ce tableau a été présenté dans mon mémoire de maîtrise et remis ici pour faciliter la capture des informations (Ducharme, 2007).



**Tableau 1.2 Résumé d'études de caractérisation structurale de protéines de liaison pour la CP\***

Matériel biologique	Méthode d'analyse	Profil électrophorétique de la préparation de protéines de liaison	Référence
Érythrocytes humains	Chromatographie sur CP-agarose	1 bande (60 kDa)	(Barnes et Frieden, 1984)
Érythrocytes humains	Chromatographie sur CP-agarose	3 bandes (130, 67, 50 kDa)	(Puchkova <i>et al.</i> , 1990, 1991)
Érythrocytes de rat	Réticulation croisée Retardement de mobilité sur gel	Résultats peu concluants Résultats peu concluants	(Stern et Frieden, 1993) (Stern et Frieden, 1993)
Vésicules placentaires humaines	Chromatographie sur CP-agarose	3 bandes (90, 45, 40 kDa)	(Hilton <i>et al.</i> , 1995)
Cellules endothéliales du foie	Chromatographie sur CP-agarose	1 bande (35 kDa) ; pI 5,2	(Omoto et Tavassoli, 1989, 1990)
Fibroblastes humains (lignée HT-1080)	IP du récepteur**	3 bandes (67, 47 et 20 kDa)	(Sasina, Puchkova et Gaitskhoki, 1998)

\* Ce tableau a été présenté dans mon mémoire de maîtrise et remis ici pour faciliter la capture des informations (Ducharme, 2007).

\*\* Immunoprécipitation (IP) à l'aide d'un anticorps produit contre le récepteur qui aurait été cloné.

### 1.7 Profil ontogénique de l'expression de la CP

Des études qui ont analysé l'expression de la CP au cours du développement embryonnaire chez la souris ont montré que la CP est exprimée dès le jour embryonnaire (E) 15 dans le foie de l'embryon, ce qui coïncide avec le début de la formation de cet organe. Par la suite, l'expression de la CP demeure constante jusqu'au jour post-natal (P) 9, après quoi elle décroît progressivement jusqu'à l'aube de l'âge adulte, soit à 6 semaines (Puchkova *et al.*, 1994). D'autre part, une étude réalisée chez le rat rapporte que la CP est exprimé encore plus tôt au cours du développement embryonnaire, soit dès E10 et cela, dans le liquide du sac vitellin, le sérum et le liquide amniotique de l'embryon. Il est à noter que la CP détectée n'est pas d'origine maternelle; elle ne provient donc pas des échanges mère-fœtus. Les auteurs de l'étude suggèrent que la CP serait d'abord synthétisée à partir des cellules de l'endoderme dans le sac vitellin durant l'organogénèse (de E10 à E16), puis par la suite de manière prédominante par le foie durant la période fœtale du développement (E17 à E22) (Gorbunova et Baranov, 1984). Quelques années plus tard, il a été montré par Northern blot que l'ARNm codant pour la CP est exprimée dans le cerveau, chez le rat, au cours du développement embryonnaire, soit dès E14.5, et que l'expression du transcrit semble diminuer dans le cerveau (entier) à l'âge adulte (Thomas, Schreiber et Jaworowski, 1989). Une étude plus récente, réalisée chez des rats post-nataux et utilisant des techniques de réaction de polymérase en chaîne après transcription inverse (RT-PCR) et d'immunobuvardage, a confirmé la présence du transcrit de même que de la protéine au jour P7 et les suivants. L'expression des deux entités croît graduellement avec l'âge, atteignant un niveau maximal à P21 dans le cortex cérébral, à P63 dans l'hippocampe et à P196 (28 semaines) dans le striatum et la substance noire. Ces résultats suggèrent que l'expression de la CP varie selon l'âge et la région du cerveau (Chang *et al.*, 2005). D'autre part, des études par immunohistochimie effectuées sur des embryons de poissons zèbres (*zebrafish*) indiquent que la CP est exprimée tôt dans le développement, soit immédiatement après l'initiation de la gastrulation qui a lieu au cours du premier tiers de la période embryonnaire (voir section 2.1). La CP est alors retrouvée au niveau de l'endoderme dorsal et dans les premières cellules hépatiques à voir le jour au-dessus du sac vitellin. Progressivement, la CP sera exprimée majoritairement par le foie (Korzh, Emelyanov et Korzh, 2001).

## 1.8 CP et désordres du cerveau

L'intérêt que suscite la CP dans les maladies du cerveau remonte à plus de deux décennies, lorsque des chercheurs ont découvert la présence de dépôts de fer dans le cerveau de patients souffrant d'acéruloplasminémie, i.e. de déficience en CP dans l'organisme (Miyajima *et al.*, 1987). Plus encore, ces patients présentaient des caractéristiques cliniques telles l'ataxie cérébelleuse et des symptômes associés à la démence (Yonekawa *et al.*, 1999). Depuis, d'autres études ont pris le relais afin de révéler de possibles liens entre des concentrations anormales de CP dans l'organisme, des anomalies dans l'homéostasie du cuivre et du fer, et des maladies ou désordres de nature développementale comme dégénérative (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005).

### 1.8.1 CP et maladies neurodéveloppementales

Considérant le rôle vital que jouent le fer et le cuivre dans le métabolisme de l'organisme, il n'est pas surprenant de constater qu'une déficience de ces micronutriments peut avoir de lourdes conséquences, au cours du développement embryonnaire et présenter des effets qui peuvent se manifester à long terme (i.e. à l'âge adulte). Cette déficience peut notamment augmenter le risque de voir se développer des troubles mentaux tels la schizophrénie (Gambling, Kennedy et McArdle, 2011). Les effets associés au manque de fer et de cuivre se manifestent biochimiquement par la perturbation des niveaux de neurotransmetteurs, et au niveau comportemental, par la détérioration des capacités cognitives, motrices et sociales (Gambling, Kennedy et McArdle, 2011).

Des travaux menés par Heilmeyer (1941) ont relevé des concentrations sériques de cuivre anormalement élevées chez les individus atteints de schizophrénie, un trouble relié aux étapes précoces du développement du cerveau. D'autres études ont confirmé ces observations (Connemann *et al.*, 2010). L'activité ferroxidasique spécifique de la CP contenue dans le sérum sanguin est aussi plus élevée chez les individus schizophrènes et il est proposé que les concentrations en cuivre plus élevées jouent un rôle dans l'apparition de la schizophrénie en exacerbant une dérégulation de la synthèse dopaminergique (Connemann *et al.*, 2010 ; Wolf, Kotun et Meador-Woodruff, 2006).

L'autisme est un autre trouble neurologique qui prend racine au cours du neurodéveloppement. Des études tentent d'établir des liens entre la CP, les dommages oxydatifs et l'autisme. Ainsi, il est rapporté que les niveaux de Tf et de CP, deux protéines antioxydantes majeures dans le sérum sanguin, diminuent chez les enfants atteints d'autisme (Chauhan et Chauhan, 2006). Une autre étude portant sur le profil antioxydant du plasma sanguin chez des adolescents atteints du syndrome d'Asperger, une forme atténuée d'autisme, a révélé des niveaux faibles de cuivre et de CP (Parellada *et al.*, 2012). Très récemment, une méta-analyse de plusieurs études expérimentales a permis de corrélérer l'expression de certains bio-marqueurs reliés au stress oxydatif avec la pathologie. Bien que la CP puisse protéger contre le stress oxydatif, son implication dans l'autisme demeure mal établi (Frustaci *et al.*, 2012).

### 1.8.2 CP et maladies neurodégénératives

De plus en plus d'études suggèrent qu'il y aurait des liens entre la CP et les maladies neurodégénératives. Ces maladies pourraient s'avérer néfastes pour la CP et affecter ses activités bénéfiques, ou encore le mal fonctionnement de la CP pourrait être un facteur étiologique ou aggravant et servir ultimement de bio-marqueur de la maladie.

Les gens atteints par la maladie d'Alzheimer, une maladie associée au vieillissement du cerveau, présente une activité oxydasique de la CP sérique plus faible (Connemann *et al.*, 2010). Des études ont conclu que des concentrations élevées de cuivre libre dans la circulation étaient corrélées avec les déficits fonctionnels et anatomiques reliés à cette maladie, de même qu'à la présence de bio-marqueurs céphalo-rachidiens reconnus pour le diagnostic de l'Alzheimer (*e.g.* protéines  $\beta$ -amyloïde et phospho-Tau) (Squitti *et al.*, 2008). D'autre part, les concentrations de cuivre mesurées dans le cerveau ne sont pas affectées par la maladie (Squitti *et al.*, 2007). En ce qui a trait aux concentrations sériques de la CP chez ces patients, ils se sont avérés similaires à ceux ne souffrant pas de la maladie. Une autre étude a cependant rapporté qu'une quantité appréciable de CP non-fonctionnelle (apoCP) est détectée dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints d'Alzheimer, ce qui pourrait faire de cette protéine un bio-marqueur complémentaire pour cette maladie (Capo *et al.*, 2008). L'analyse protéique de la CP à partir du sérum et du cerveau de patients atteints

d'Alzheimer, par électrophorèse sur gel 2D, a permis d'identifier la présence de fragments (< 50 kDa) de la CP. Ces fragments ne sont pas présents chez les individus sains. Les formes de haut poids moléculaire de la CP (i.e. 115 et 135 kDa dans le sérum et 135 kDa dans le cerveau) ne sont pas affectées par la maladie (Squitti *et al.*, 2007). Les auteurs avancent comme hypothèse que des défauts d'incorporation de cuivre dans la CP au moment de sa biosynthèse, rendent l'apoCP susceptible à une dégradation (i.e. protéolyse) rapide. Cette hypothèse expliquerait la présence de fragments protéolytiques de la CP dans le sérum et le cerveau des patients souffrant d'Alzheimer et le fait qu'elle soit combinée à des concentrations de cuivre libre plus élevées que la normale dans le sérum (Squitti *et al.*, 2008). Une autre possibilité serait que des concentrations anormalement élevées en cuivre induisent un stress oxydatif qui à son tour favoriserait la protéolyse de la CP. D'autres études seront nécessaires afin de valider ou non ces hypothèses et ainsi clarifier l'importance que prend la CP dans la maladie d'Alzheimer.

Outre le rôle important que joue la CP dans le métabolisme du fer de par son activité ferroxidasique, la CP peut oxyder bien d'autres substrats physiologiques (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). Il a été suggéré que la CP participe à l'oxydation des catécholamines dans le cerveau. Un dérèglement dans la gestion de ces neurotransmetteurs dans des régions spécifiques du cerveau est un facteur qui sous-tend la maladie de Parkinson et peut-être d'autres maladies neurodégénératives (Floris *et al.*, 2000). On peut penser que des fluctuations de la CP puissent causer un tel dérèglement.

Enfin, des études suggèrent que des déficiences du métabolisme du fer, en association à des défauts de la CP, seraient impliquées dans certaines maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson, d'Alzheimer et d'Huntington (Berg et Hochstrasser, 2006 ; Kono, 2012). D'autres études s'avèrent cependant nécessaires afin d'éclaircir les mécanismes, bénéfiques ou non, par lesquels la CP est impliquée dans ces maladies. Il n'est pas exclu aussi que des défauts de fonctionnement de la CP-GPI dans le cerveau puissent entraîner une augmentation des niveaux de radicaux libres, favorisant du coup l'apparition de maladies neurodégénératives (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005).

### 1.8.3 Autres maladies reliées à la CP et ayant un impact sur la santé neurologique

Qu'il s'agisse de l'acéruloplasminémie, une maladie qui se traduit par une absence de CP fonctionnelle, ou encore de maladies qui affectent indirectement l'activité enzymatique de la CP telles les maladies de Wilson et de Menkes, ce sont trois maladies dont les effets engendrés sur la CP peuvent influencer l'apparition de conditions neurodégénératives (Connemann *et al.*, 2010).

Il est intéressant de noter que la relation entre la CP et des maladies neurodégénératives a d'abord été soulevée par des études qui ont montré une diminution de l'activité enzymatique associée à la CP dans le sérum de patients atteints de la maladie de Wilson. Cette maladie est caractérisée par une faible concentration sérique de cuivre, ce qui en constitue d'ailleurs le marqueur diagnostique le plus important (Squitti *et al.*, 2008). L'absence du transporteur de cuivre ATPase ATP7B ou des mutations d'origine génétique de cette protéine empêche la translocation et l'incorporation du cuivre dans la CP au cours du mécanisme de sécrétion de la CP qui a lieu dans le foie. Il en résulte la sécrétion dans la circulation sanguine de la forme inactive de la CP (apoCP) qui est alors rapidement dégradée (Terada *et al.*, 1998). De plus, le transporteur non fonctionnel n'arrive pas à rejeter, dans la bile, l'excès de cuivre présent dans le foie, ce qui entraîne des lésions hépatiques et ultimement une cirrhose. Cependant, il n'y a pas que le foie qui soit affecté; des dépôts de cuivre se forment aussi dans certaines régions du cerveau et pourraient être à l'origine de l'apparition de symptômes caractéristiques des maladies neurodégénératives, tels l'hyperkinésie, le tremblement, le trouble du langage et la démence (Benhamla *et al.*, 2007 ; Vassiliev, Harris et Zatta, 2005)

Dans le cas de la maladie de Menkes, il s'agit du transporteur de cuivre ATP7A qui est affecté, provoquant une accumulation de cuivre principalement dans les cellules gastro-intestinales du duodénum, combinée à une diminution du cuivre dans la circulation systémique et les organes périphériques. Cette déficience en cuivre a pour conséquence notamment de réduire le transport du cuivre à travers la membrane hémato-encéphalique vers le SNC. Les patients atteints de cette maladie manifesteront des symptômes classiques reliés à des troubles neurologiques tels la convulsion et l'ataxie. Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces symptômes neurologiques ne soient pas clairement identifiés,



il est proposé que la diminution de l'activité d'enzymes à cuivre dans le cerveau, de même que des dérèglements dans la modulation du système glutaminergique (un neurotransmetteur important du SNC; voir section 2.8), conséquences de la carence de cuivre dans le SNC, soient des pistes d'explication potentielles (Wang *et al.*, 2011). Les études portant sur les maladies de Wilson et de Menkes mettent donc en évidence la corrélation entre l'homéostasie du cuivre et ses impacts sur le fonctionnement de la CP et la santé neurologique.

L'homéostasie du fer est en cause dans l'acéruloplasminémie, caractérisée par des dépôts de fer dans divers organes dont le cerveau (neurones et astrocytes). Une corrélation existe entre l'absence de synthèse de CP chez les individus acéruloplasminémiques et la manifestation de symptômes neurologiques semblables à ceux répertoriés pour les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005 ; Xu *et al.*, 2004).

Les liens de causes à effets exacts qui existent entre les maladies mentales et de faibles concentrations sériques de CP comme celles retrouvées chez les gens souffrant de la maladie de Wilson, de Menkes ou encore d'acéruloplasminémie demeurent pour le moment obscurs (Connemann *et al.*, 2010).

#### **1.8.4 Modèle animal déficient en CP et ses caractéristiques**

L'équipe du Dr Samuel David de l'Université McGill (Montréal, Qc, Canada) a développé il y a de cela plus d'une décennie un modèle de souris mutantes qui n'expriment pas la CP. Ces souris ont été génétiquement modifiées de telle sorte que l'exon 1 de la CP, renfermant le site d'initiation de la transcription de l'ARNm, se trouve absent au niveau du gène (Patel *et al.*, 2002). L'absence du gène fut confirmé au niveau de l'ADN génomique par buvardage de type Southern, et de la protéine par immunobuvardage du sérum au moyen d'un anticorps spécifique anti-CP. Ces souris déficientes en CP ( $CP^{-/-}$ ) sont parfaitement viables et sont capables de se reproduire normalement. Outre le fait que ces souris présentent des dépôts de fer dans différentes régions du SNC telles que le cervelet et le tronc cérébral à l'âge adulte, il a été montré que celles-ci ont un déficit au niveau de la coordination motrice. Ce symptôme physique est associée à une perte de neurones dopaminergiques dans le tronc cérébral (Patel *et al.*, 2002). Également, il a été montré que ces souris n'expriment pas la Fpn

(De Domenico *et al.*, 2007), ce qui suggère une altération éventuelle du métabolisme du fer dans le cerveau. Sachant que des dépôts de fer sont une caractéristique retrouvés dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, il semblerait qu'une relation existe entre la CP et les maladies neurodégénératives (Jeong et David, 2006).

## **CHAPITRE II : DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU ET NEUROMIGRATION**

Les progrès considérables réalisés dans les domaines de l'embryologie expérimentale, de la génétique du développement et de la biologie moléculaire depuis les années 1980 mènent à une compréhension de plus en plus raffinée de la biologie développementale. Dans cette présente section, nous décrivons les aspects chronologiques du développement du système nerveux, en portant une attention particulière au développement du cerveau et aux grandes étapes qui le caractérisent. Puisqu'un des volets de cette thèse porte sur l'étude développementale de cerveaux de souris (voir chapitre VII), notre propos portera sur le développement de la souris. La gestation se déroule sur 21 jours en moyenne et ces jours sont notés jour embryonnaire 1 (E1) à jour embryonnaire 21 (E21). Le cerveau continue de se développer après la naissance à partir du jour post-natal 0 (P0).

### **2.1 Premières étapes du développement de l'embryon**

Le développement embryonnaire, qui permet d'asseoir les bases nécessaires à la formation de l'organisme entier, est subdivisé en plusieurs étapes clés. Suivant sa fécondation par un spermatozoïde, l'ovule subira une série de divisions cellulaires successives; c'est l'étape de segmentation pour la formation de la blastula. Au cours de blastulation, l'embryon n'augmente pas de volume. Chaque division cellulaire génère deux cellules filles dont leur taille est deux fois plus petite que celle de la cellule mère (Slack, 2004). Une proportion des cellules ainsi nouvellement produites acquiert un caractère polaire et constituera le trophoblaste entourant l'embryon et les structures extra-embryonnaires, alors que les cellules non polarisées formeront le bouton embryonnaire qui sera à l'origine de l'embryon lui-même. À la fin de la blastulation, il est possible de distinguer quatre pôles, soient les pôles animal et végétatif dans l'axe nord-sud, et les pôles ventral et dorsal dans l'axe est-ouest. C'est à partir de la région dorso-végétative de la blastula que proviendront les structures rudimentaires et essentielles pour la construction du système nerveux central, soit les somites, la notocorde et le tube neural (Rice et Barone, 2000 ; Wolpert, 2004).

Une fois formée, la blastula entame la phase de gastrulation, une étape caractérisée par une extraordinaire réorganisation cellulaire de l'embryon impliquant des changements dans la forme, le mouvement et l'adhérence des cellules. Le positionnement des cellules et les interactions qu'elles auront avec leurs voisines détermineront leur devenir développemental. La gastrulation se produit vers E6-E7 chez la souris (Slack, 2004 ; Wolpert, 2004). C'est au cours de cette étape développementale que naîtront les trois feuillets germinatifs : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme desquels originent tous les types cellulaires et tissulaires qui composent l'animal. Précisément, les cellules de l'endoderme, le feuillet le plus interne de la gastrula, donneront le tube digestif ainsi que les poumons. Les cellules contenues dans le feuillet mésodermique, la couche mitoyenne, généreront les organes internes tels le cœur, le foie, les reins, les os, de même que les cellules sanguines et immunitaires. Les cellules du feuillet le plus externe, l'ectoderme, sont à l'origine de la formation de la peau et du système nerveux. Il est à noter que l'expression des gènes Hox revêt une importance capitale pour le bon positionnement des trois feuillets germinatifs (Wolpert, 2004).

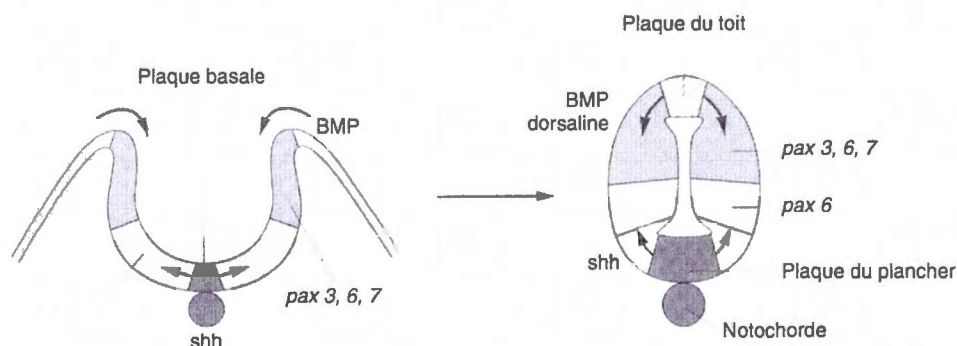
C'est également au cours de la gastrulation que les axes dorso-ventral et antéro-postérieur de l'embryon seront spécifiés, ces axes étant naturellement sous la gouverne de la famille de gènes Hox (Slack, 2004). À la fin de la gastrulation, l'embryon présentera des extrémités tête et queue reconnaissables et trois structures particulières : la ligne primitive qui définit le plan symétrique bilatéral de l'embryon, la notocorde qui définit l'axe antéro-postérieur de l'embryon et la plaque neurale qui s'étend également le long de cet axe. Chez la souris, ce stade de développement survient vers E7.5 (Slack, 2004). La plaque neurale est composée d'une couche de cellules aplaties issues du feuillet ectodermique. Sa formation est sous le contrôle des protéines noggine et chordine qui agissent notamment comme des inhibiteurs des facteurs de croissances de la famille des protéines morphogéniques de l'os (BMP), ainsi que sous l'action de l'acide rétinoïque (AR), toutes ces molécules ouvrant la voie à la spécification neuronale (Wolpert, 2004). La notocorde est un cylindre compact formé par des cellules du feuillet mésodermique, situé directement sous la plaque neurale, et s'étend sur toute la longueur de l'embryon, dans l'axe antéro-postérieur (Chizhikov et Millen, 2004).

En somme, la gastrulation est l'étape qui permet d'établir le plan organisationnel de base des différents organes en vue de l'organogénèse qui suivra. C'est à partir de ce moment que se développera le système nerveux proprement dit, un processus qui débute par l'étape de neurulation.

## 2.2 Description phénoménologique de la neurulation

C'est au cours de la neurulation que sera initiée la formation du système nerveux à partir de l'ectoderme. La neurulation débute par la formation du tube neural, une structure rudimentaire à l'origine du SNC et à partir de laquelle l'encéphale et la moelle épinière se formeront (fig. 2.1) (Chizhikov et Millen, 2004 ; Fix, 2006). Chez la souris, la neurulation débute vers E8-9 (Slack, 2004). Essentiellement, des changements dans la forme des cellules de la plaque neurale permettront aux bords de la plaque neurale de se soulever, créant une invagination de la plaque neurale, laquelle prend la forme d'une gouttière. Les rebords vont se refermer sur eux-mêmes puis se souder afin de former le tube neural. Chez les mammifères, la soudure commence dans la région du cerveau postérieur puis, à la manière d'une fermeture éclair, se poursuit simultanément vers l'avant et vers l'arrière de l'embryon (Wolpert, 2004). Il est à noter que parallèlement à la formation du tube neural, d'autres organes commenceront à se former, comme le cœur, les yeux, le foie et les membres (Wolpert, 2004).

La notocorde ainsi que la plaque basale et la plaque du toit, les futures régions respectivement ventrale et dorsale du tube neural, produisent plusieurs facteurs qui sont déterminants dans la formation du tube neural. Ces facteurs sont notamment la protéine *sonic hedgehog* (Shh), la dorsaline, les BMP, l'AR et les facteurs de transcription Pax (Wilson et Maden, 2005 ; Wolpert, 2004). Des changements dans le profil d'expression de molécules d'adhésion à la surface de la plaque neurale, telles la N-cadhérine et la molécule d'adhésion cellulaire neuronale (N-CAM), sont nécessaires pour former le tube neural. Au niveau de la tête de l'embryon, le tube neural antérieur formera trois vésicules qui deviendront les cerveaux antérieur (prosencephale), moyen (mésencéphale) et postérieur (rhombencéphale). De chaque côté du tube neural restant, le mésoderme s'épaissit et se subdivise en structures appelées somites, les précurseurs anatomiques des vertèbres. Le tube neural dans la région



**Figure 2.1 Formation du tube neural.** Au départ, les rebords de la plaque neurale se soulèvent et créent une invagination pour former une gouttière. Ensuite, les rebords vont se refermer sur eux-mêmes puis se souder afin de former le tube neural. Le facteur *sonic hedgehog* (Shh) provenant de la notocorde induit l'expression de son propre gène dans la plaque du plancher. Les facteurs de croissance de la famille des protéines morphogéniques de l'os (BMP) provenant de l'épiderme, combinés à la dorsaline, induisent la plaque du toit. Les facteurs de transcription pax participent à la détermination dorso-ventrale du tube neural. Figure tirée de Slack (2004).

des somites formera quant à lui la future moelle épinière (Wolpert, 2004). Il est à noter que de chaque côté de la face dorsale du tube neural se formera une excroissance appelée crête neurale et qui sera à l'origine du système nerveux périphérique (SNP). Ultimement, la crête neurale se détachera du tube pour former les ganglions sensitifs et autonomes de la racine dorsale, les nerfs crâniens et périphériques, les cellules de Schwann. Finalement, il y aura formation des méninges, une structure composée de trois enveloppes (pi-mère, arachnoïde et dure-mère) et du liquide cérébro-spinal, qui recouvriront et protégeront l'encéphale ainsi que la moelle épinière (Fix, 2006 ; Rice et Barone, 2000).

### 2.3 Spécification neuronale et prolifération cellulaire

Avant que ne débute véritablement la formation des différentes parties du SNC, il y a une phase importante de prolifération de neurones. Cette production de neurones est assurée par les neuroblastes, eux-mêmes produits à partir des cellules souches du neuroectoderme se trouvant le long de la plaque neurale. Les cellules issues du neuroectoderme ne deviendront pas toutes des cellules précurseurs de neurones (i.e. neuroblastes). Ainsi, la propension à la



spécification neuronale des cellules produites par le neuroectoderme est contrôlée par un mécanisme d'inhibition dit latéral, faisant intervenir le récepteur Notch et son ligand Delta.

L'activation du récepteur Notch par son ligand Delta (deux protéines membranaires) empêche l'expression de gènes préneuraux tels ceux de la neurogénine et de NeuroD et donc la différenciation d'une cellule souche en neuroblaste. Au départ, toutes les cellules issues du neuroectoderme expriment Notch et Delta. Dans un phénomène de compétition, certaines cellules prendront l'avantage sur les autres en exprimant Delta plus tôt ou encore plus fortement que leurs concurrentes voisines. Les cellules qui s'engagent les premières dans la voie neuronale vont ainsi inhiber la différenciation neuronale des cellules adjacentes en stimulant plus fortement les récepteurs Notch des cellules voisines, ce qui aura comme conséquence de réprimer chez ces cellules l'expression de la neurogénine, NeuroD ainsi que celle de Delta. Ces cellules deviennent alors des cellules épidermiques (Slack, 2004).

Selon leur emplacement dans le tube neural, les neuroblastes ne donneront pas les mêmes types de neurones. Ainsi, les neurones moteurs (motoneurones) seront générés à partir du côté ventral, alors que les neurones commissuraux proviendront de la région dorsale du tube neural. Il est connu que l'expression de Shh à partir de la plaque basale, i.e. la partie la plus ventrale du tube neural, est impliquée dans l'induction des motoneurones. Les facteurs de croissance BMP-4 et 7 et la Dorsaline-1, une protéine de la famille des facteurs de croissance transformants-béta (TGF- $\beta$ ), sont quant à eux importants pour l'induction du côté dorsal. Les neurones sensoriels sont issus des crêtes neurales latérale et dorsale (Wolpert, 2004).

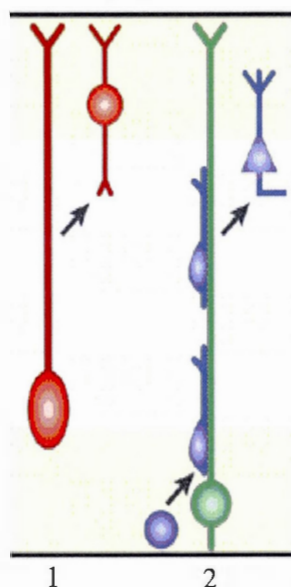
Dans sa partie antérieure, le tube neural produit un nombre incroyable de neurones et de cellules gliales à partir des cellules progénitrices du neuroépithélium bordant la lumière du tube neurale. Cette région porte le nom de zone ventriculaire (ZV) et donnera naissance aux neurones corticaux. Dans le cortex en développement chez les vertébrés, la spécification des neurones est le résultat de la division asymétrique des cellules progénitrices, un mécanisme qui induit la séparation de manière non-uniforme des facteurs cytoplasmiques Notch-1 et Numb au sein des cellules-filles. La division asymétrique produit deux nouvelles cellules

dont l'une d'elles contient tout le Notch-1 et deviendra un neuroblaste, puis un neurone. Au cours de la migration neuronale subséquente (section 2.4), ce neurone post-mitotique nouvellement produit migrera hors de la ZV afin de coloniser le cortex en développement. L'autre cellule produite par la division asymétrique contient la protéine Numb qui lui permet de conserver son caractère de cellule-souche « limité ». Elle demeure dans la zone de prolifération où elle subira un ou d'autres cycles de division cellulaire. Ces divisions peuvent être asymétriques (donnant une cellule précurseur de neurones et un neurone) ou symétriques (donnant deux cellules précurseur de neurones) (Wolpert, 2004). Notons que le moment d'apparition (i.e. la date de naissance) du neurone dans cette série de divisions ainsi que l'environnement dans lequel il naît sont des facteurs déterminants dans sa spécification comme neurone cortical (Wolpert, 2004).

L'importante phase de prolifération cellulaire est suivie par un processus hautement organisé de déplacement des neurones qui permettra à ces derniers de gagner leur emplacement définitif afin de terminer leur différenciation et leur maturation. L'ensemble des étapes de prolifération, de migration et de maturation qui donnent naissance aux neurones du cortex s'appelle la corticogénèse. La section suivante aborde l'étape de migration neuronale.

## **2.4 La corticogénèse : la grande migration neuronale**

La migration neuronale est un processus qui nécessite l'intervention de plusieurs molécules dont des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion et de guidage cellulaires ainsi que des composantes de la matrice extracellulaire. Cette migration est nécessaire à la formation des différentes structures des SNC et SNP. Nous détaillons comme exemple ici la migration qui se produit dans le cortex cérébral. Le cortex se forme à partir de millions de cellules migratoires qui se disposent en six couches successives. Les neurones immatures peuvent migrer de deux façons : radialement, en partance de la ZV pour atteindre les zones laminales (ZL) également appelé la zone marginale (ZM); et tangentiellement à travers les laminae pour former des couches de neurones denses. Chez la souris, la migration radiale des neurones post-mitotiques se déroule essentiellement de E12 à E18-19 (Alcantara *et al.*, 1998).



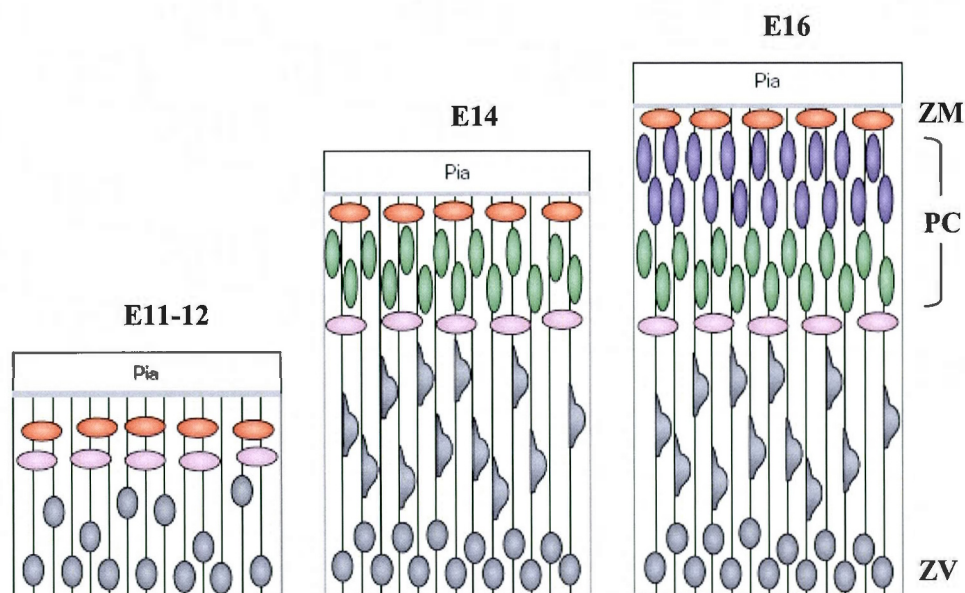
**Figure 2.2 Représentation schématique de la migration neuronale.** Le mode de migration radiale par translocation somale (1) dans lequel les neurones se déplacent par étirement du corps cellulaire. Le mode de migration radiale (2) par interaction avec, et déplacement sur, des fibres gliales, afin de rejoindre leur emplacement définitif. Figure tirée de Nadarajah et Parnavelas (2002).

Lors de la migration radiale, les neurones produits dans la zone proliférative se déplacent de manière orthogonale afin de franchir toute la profondeur du parenchyme (fig. 2.2) (Nadarajah et Parnavelas, 2002). La migration radiale se subdivise en deux modes de mouvement, soit 1) par translocation somale ou étirement du corps cellulaire qui a cours essentiellement lors des étapes précoces de la corticogénèse, au moment où la surface cérébrale est relativement rapprochée de la ZV (i.e. lorsque le tissu cérébral est mince), ou encore 2) par déplacement le long de fibres gliales pendant les étapes ultérieures de la formation corticale, quand la surface cérébrale est considérablement plus éloignée (i.e. le tissu cérébral épais) (Nadarajah et Parnavelas, 2002). La migration radiale est le mode de migration le plus répandu dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet en développement, et est mieux documentée que la migration tangentielle (Nadarajah et Parnavelas, 2002 ; Wolpert, 2004).

Les fibres radiales sont de mieux en mieux caractérisées. Elles sont formées par les cellules gliales radiales qui sont les premières cellules à se différencier dans la ZV. Les cellules radiales gliales projettent de longs appendices perpendiculairement à la surface ventriculaire en direction de la surface cérébrale, créant les fibres radiales nécessaires à la migration dirigée des neurones. Les cellules gliales radiales sont capables de division symétrique (deux cellules gliales radiales) comme de division asymétrique (ex : une cellule radiale gliale et un neurone). Les cellules radiales gliales deviennent dans le temps des cellules progénitrices de neurones, puis des cellules progénitrices de cellules gliales non radiales (*e.g.* astrocytes et oligodendrocytes) (Rowitch et Kriegstein, 2010).

Les mécanismes cellulaires sous-jacents à la migration radiale se font en trois étapes; a) l'extension des extrémités des neurones dans le sens du déplacement et l'exploration de l'environnement immédiat en quête de signaux attractifs ou répulsifs; b) la nucléocinétique qui définit le mouvement du noyau vers la zone d'extension; et c) la rétraction de la traîne postérieure de la cellule (Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001). Des études ont démontré que l'extension des cellules est le fruit d'une réorganisation des microfilaments d'actine, de même qu'une réorganisation des microtubules impliqués dans la nucléocinétique (Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001 ; Nadarajah et Parnavelas, 2002). Les microfilaments d'actine sont sous la gouvernance notamment des GTPases de la famille des Rho ainsi que de protéines associées à la régulation du cytosquelette d'actine dont la cofiline (Arber *et al.*, 1998). La chronologie des étapes menant à la formation des couches du cortex (fig. 2.3) a une importance capitale puisqu'un dérèglement peut entraîner de graves désordres neurologiques (voir section 3.1.2) (Gressens, 2005). Au cours du développement embryonnaire normal du cortex, la première vague de neurones post-mitotiques, produits depuis la ZV, migre en direction de la ZM pour s'installer dans le cortex et former la première couche de neurones. Cette première couche que l'on nomme la pré-plaque deviendra éventuellement la sous-plaque corticale. Chez la souris, l'élaboration de la pré-plaque a lieu vers E12 (Bar, Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2000). Les futures cohortes de neurones post-mitotiques migreront au-delà de leurs homologues plus âgés qui forment la première couche de neurones, afin de former progressivement des couches de plus en plus superficielles. Il est donc assumé que les neurones occupant la même couche ont environ le même âge. L'empilement successif des





**Figure 2.3 Élaboration des couches de neurones dans le cortex.** Les neurones immatures migrent de la zone ventriculaire (ZV) vers la plaque corticale (PC) pour former les diverses couches neuronales. La zone marginale du cortex en développement est constituée des cellules de Cajal-Retzius (cellules en rouge) qui expriment la reeline. La première vague de neurones post-mitotiques à atteindre la ZV vont constituer la pré-plaque du cortex, vers E11-12 (cellules en rose; couche 1). Cette migration se fait essentiellement par translocation somale. Les futures cohortes de neurones post-mitotiques migreront au-delà de leurs homologues plus âgés qui forment la première couche de neurones, afin de former progressivement des couches de plus en plus superficielles. Ce mode de migration se fait à l'aide des fibres gliales sur lesquelles les neurones s'accrochent puis migrent. Au jour E14, les couches neuronales 2 et 3 (cellules en vert) sont formées, tandis que les couches neuronales 4 et 5 (cellules en bleu) sont intégrées vers E16. Les couches neuronales qui forment la PC se forment ainsi de l'intérieur vers l'extérieur du cortex en développement. ZM; zone marginale. Figure adaptée de Tissir et Goffinet (2003).

couches neuronales développera et épaissira la région définie entre la sous-plaque et la ZM, soit la plaque corticale (PC). La lamination du cortex se fait donc selon un gradient de l'intérieur vers l'extérieur (Goffinet *et al.*, 1999).

Arrivés à leur destination, les neurones se dissocieront des fibres gliales et pourront gagner leur emplacement définitif au sein de la PC et poursuivre leur différenciation et leur maturation. Cette étape est considérée comme la dernière de la migration neuronale (Lambert

de Rouvroit et Goffinet, 2001). À la toute fin de la corticogénèse, la ZV ne constitue plus qu'une couche unique de cellules épendymaires limitant les ventricules cérébraux (Kubis et Catala, 2005). Les cellules gliales vont rétracter leur long appendice afin de libérer l'espace et permettre aux neurones d'établir les prolongements axonaux et dendritiques ainsi que les connections synaptiques indispensables au bon fonctionnement du cerveau (Wolpert, 2004).

Outre la migration radiale, il existe aussi un mode de migration des neurones moins bien connu : la migration tangentielle, ou horizontale, qui serait de nature neurophilique. Les neurones se déplacent de façon parallèle à la surface germinative, le long d'axones ou d'autres neurones, et franchissent ainsi de grandes distances (Nadarajah et Parnavelas, 2002). Certains neurones migrant de manière tangentielle doivent franchir plusieurs centaines de micromètres dans une région déjà dense en cellules. Ils proviennent d'autres régions du cerveau et s'immiscent dans le tissu d'accueil (interneurones). Ce mode de neuromigration est particulièrement sollicité dans la formation du bulbe olfactif et des régions latérales du néocortex (Rice et Barone, 2000). Il subsiste encore bon nombre d'interrogations quant aux substrats employés par ces neurones pour assurer et guider leur déplacement dans le cortex, mais il semble clair que leur migration ne dépend pas de la présence de cellules radiales gliales (Nadarajah et Parnavelas, 2002).

Dans le contexte du développement du cerveau, il est important de souligner que la naissance de l'animal n'amène pas de transition nette dans les diverses étapes du neurodéveloppement. À cet égard, le développement de l'hippocampe et du cervelet en fournit de bons exemples. La formation du gyrus dentelé dans l'hippocampe, qui débute au cours de la corticogénèse avec une phase importante de prolifération cellulaire, se poursuivra au stade postnatal par une seconde phase de prolifération neuronale. Le développement du cervelet passe par une première phase de prolifération et de migration neuronales avant la naissance et une autre phase après la naissance (Rice et Barone, 2000). La synaptogénèse et la myélination des neurones se font aussi sur une longue période et leur déroulement chevauche les périodes prénatale et post-natale.

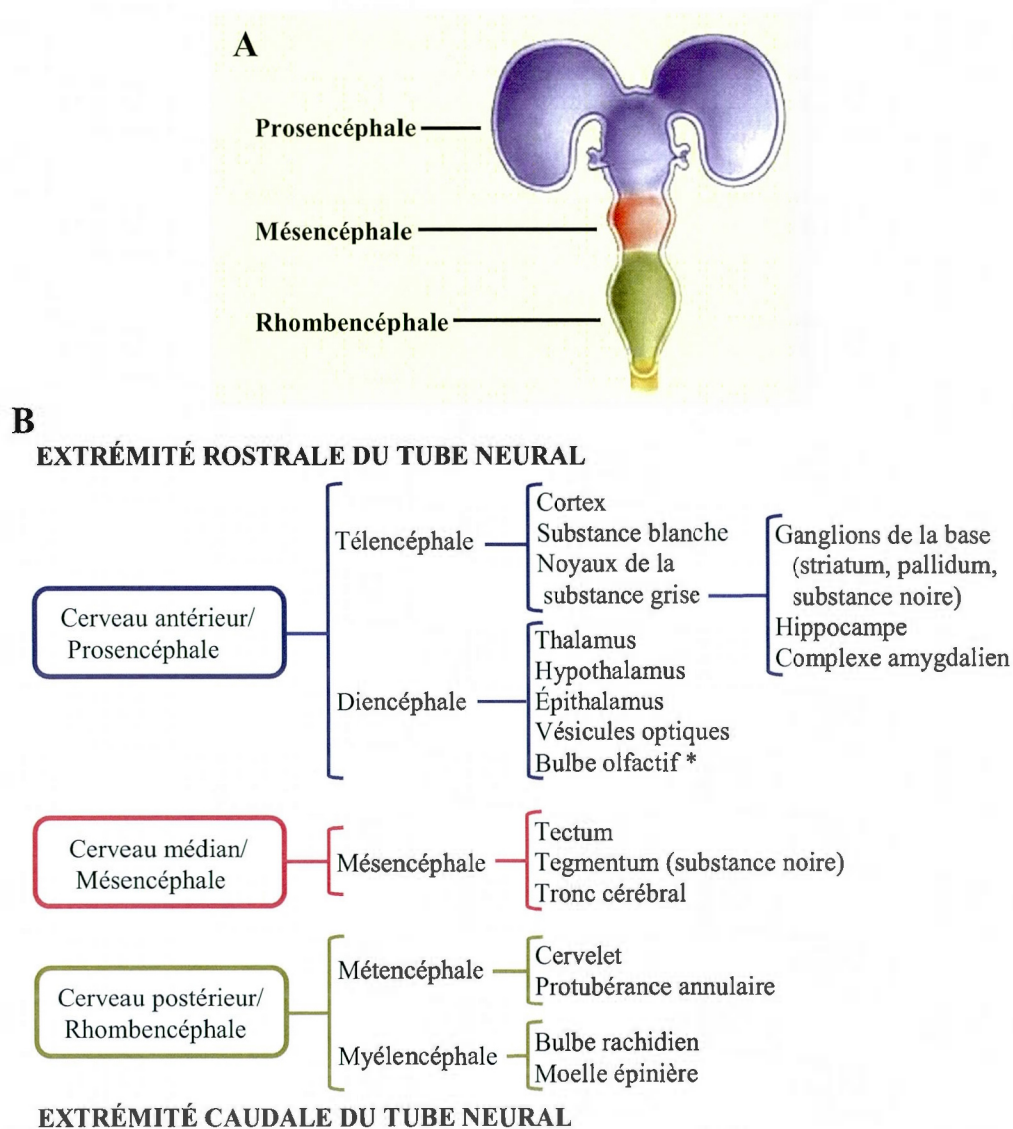


## 2.5 La formation des grandes régions du cerveau et leurs principales fonctions

La prolifération et la migration neuronales sont à l'origine de la création des différentes structures cérébrales. L'ébauche de ces grandes structures sera accomplie peu avant la naissance. Ce processus début tôt, au cours de la neurulation, par la subdivision du tube neural antérieur en trois vésicules primaires, soit le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (Le cerveau à tous les niveaux, 2002) (fig. 2.4). Par la suite, ces vésicules se subdivisent à nouveau pour former cinq grandes vésicules secondaires, soient le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélencéphale (Rakic, 2006 ; Rice et Barone, 2000).

Deux protubérances naîtront de la partie supérieure du télencéphale et donneront lieu aux deux hémisphères cérébraux. Ces hémisphères seront le siège notamment des aires motrice et sensorielle. Sur la partie ventrale de chacun des hémisphères se formera une autre paire de vésicules qui deviendront le bulbe olfactif, une structure proéminente chez les rongeurs comparativement aux humains. Il est à noter que les neurones du bulbe olfactif proviennent du diencéphale. Dans le télencéphale, les neurones allongeront leurs axones pour former des réseaux de connexions avec d'autres parties du système nerveux, ce qui produira la substance blanche du cortex, le corps calleux qui relie les deux hémisphères, et la capsule interne qui reliera la substance blanche du cortex au tronc cérébral afin d'innervier les motoneurones de la moelle épinière (Fix, 2006 ; Haines et Schenk, 2012).

De la structure diencéphalique émergera deux structures, le thalamus et l'hypothalamus. Le thalamus assure le relai de l'information sensorielle et motrice vers le cortex afin qu'elle soit analysée. Il est impliqué dans la perception de la douleur. L'hypothalamus gère des mécanismes biologiques tels l'appétit, le sommeil, la température corporelle, la sécrétion d'hormones et les pulsions sexuelles. Notons également que l'hypothalamus antérieur agit sur le système nerveux parasympathique, alors que l'hypothalamus postérieur a une influence sur le système nerveux sympathique (Fix, 2006). De chaque côté du diencéphale se développent aussi des vésicules optiques qui assureront la formation de la rétine et le développement du nerf optique (Haines et Schenk, 2012).



**Figure 2.4 Représentation des grandes structures du cerveau.** **A** Schéma des trois vésicules primaires issues du tube neural antérieur (Le cerveau à tous les niveaux, 2002). **B** Description des cinq grandes vésicules secondaires et certaines des principales structures cérébrales qui en émergent. \* Les neurones du bulbe olfactif originent du diencephale. Chez la souris, ils migrent vers la partie la plus rostrale du télencéphale pour constituer le bulbe olfactif.

Le métencéphale situé dans la région postérieure du cerveau est la vésicule de laquelle émerge le cervelet, du côté dorsal, et la protubérance (le pont) du côté ventral. Le cervelet est le siège de la coordination des mouvements, du tonus musculaire et du maintien de l'équilibre

postural (Fix, 2006). Ces actions s'opèrent en étroite collaboration avec les aires motrices, somatosensorielles et pariétales du cortex. La connexion entre le cervelet et ces régions spécifiques du cortex se fait via la protubérance. Cette structure reçoit les connexions axonales en provenance des aires corticales et projette elle-même des axones dans le cervelet, permettant ainsi la transmission des informations. Le cervelet projette à son tour des prolongements axonaux dans l'aire motrice du cortex via le thalamus, assurant ainsi un contrôle des fonctions motrices. Il est à noter que le cervelet est une structure du cerveau dont le développement est majoritairement tardif en regard à l'ensemble des composantes de l'encéphale et ce, tant chez les rongeurs que chez les humains (Rice et Barone, 2000).

Le myélencéphale donnera naissance au bulbe rachidien. Cette dernière structure sert notamment au contrôle de certaines fonctions involontaires comme les battements cardiaques, la respiration et la régulation de la température corporelle. Elle joue également un rôle essentiel dans la transmission des signaux nerveux entre le cortex et la moelle épinière, car elle assure le passage de nombreuses fibres nerveuses (Fix, 2006).

La partie postérieure du cerveau (rhombencéphale) se subdivise en huit compartiments appelés rhombomères desquels émergent les cellules des crêtes neurales. Les rhombomères sont à l'origine des nerfs crâniens segmentaires, des nerfs périphériques et certains éléments squelettiques de l'oreille. Les gènes Hox sont particulièrement impliqués dans la définition et le positionnement des rhombomères et des crêtes neurales du cerveau postérieur (Wolpert, 2004).

## **2.6 La synaptogénèse et la myélinisation**

La synaptogénèse (i.e. formation des synapses) est une étape excessivement importante du développement du système nerveux. Elle commence dès les débuts de la corticogénèse, puis prend considérablement de l'ampleur jusqu'à la naissance et se poursuit dans les jours, voire même quelques semaines suivant la naissance (Rice et Barone, 2000). Chez les souris, cette étape peut s'étirer jusqu'à trois semaines post-naissance (P21). La synaptogénèse est un processus à la fois biochimique et morphologique qui permet aux neurones de créer un réseau d'interconnexions avec d'autres neurones, via leurs projections

axonales et dendritiques, mais aussi avec des fibres musculaires ou encore des cellules glandulaires. La projection d'un axone se fait par la formation et l'extension d'un cône de croissance. L'ensemble dépend de plusieurs entités : 1) du cytosquelette modelé par l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine et des microtubules de tubulines, 2) des protéines de la matrice extracellulaire telles la laminine, la fibronectine et le collagène, 3) des protéines de la surface cellulaire comme les intégrines, les sélectines, les CAM et les cadhérines, et 4) de divers signaux chimiques qui influenceront la direction de croissance de l'axone. Ces signaux regroupent des facteurs qui appartiennent à la famille des nétrines, des séphorines ou des éphrines. Ils agissent comme molécules chimioattractantes ou chimiorépressives dépendamment de l'expression de leurs récepteurs à la surface membranaire des axones (de Graaf-Peters et Hadders-Algra, 2006). La synaptogénèse est caractérisée par une forte expression de la synapsine-1, qui en devient un important biomarqueur. Elle s'opère du côté pré-synaptique, avec l'expression accrue de la synaptotagmine, la synaptophysine et la protéine associée à la croissance-43 (GAP-43), et du côté post-synaptique où la neurogranine et la protéine associée aux microtubules 2 (MAP2) sont particulièrement exprimées (Rice et Barone, 2000). Des études chez l'humain indiquent que le nombre de synapses atteint un plateau (i.e un maximum de densité synaptique) au cours de la puberté après quoi, il diminue dans toutes les régions corticales par un processus d'élimination. Il y a en fait une perte de près de 40 % de la densité synaptique entre l'âge pubère et l'âge adulte (de Graaf-Peters et Hadders-Algra, 2006).

Quelques jours avant la naissance, alors que la formation des axones (i.e. l'axogénèse) est très active, débute une période de prolifération et de différenciation de d'autres types de cellules qui assureront un rôle de soutien aux neurones du SNC en développement : les astrocytes et les oligodendrocytes. Les astrocytes ont des rôles importants dans le fonctionnement du système nerveux. Ils régulent l'expression de constituants de la matrice extracellulaire, assurent la clairance de neurotransmetteurs en excès et participent au remodelage des connexions synaptiques. Les oligodendrocytes sont responsables de la myélinisation des axones (de Graaf-Peters et Hadders-Algra, 2006). Ces cellules produisent la myéline qui sera ajoutée sous forme d'une gaine autour du prolongement axonal d'un neurone. Cette gaine sert d'isolant et permet de propager l'influx nerveux plus rapidement et

plus efficacement. Il est à noter qu'un oligodendrocyte peut myéliniser jusqu'à trente axones (Fix, 2006). La myélinisation des axones sera à l'origine de la matière blanche du cortex (Slack, 2004). Dans le SNP, la myélinisation des axones se fera via les cellules de Schwann (Rice et Barone, 2000).

Il est important de souligner qu'au cours du développement périnatal, il y aura de profonds remodelages des connexions synaptiques qui persisteront aussi tout au long de la vie adulte. Cette capacité de remodelage des connexions synaptique, que l'on nomme la plasticité synaptique, permet des réponses fines aux stimuli de l'environnement et est fortement sollicitée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, plus précisément dans le déclenchement de potentialisation à long terme (PLT) par le renforcement des connexions synaptiques. À l'opposé, d'autres connexions synaptiques se verront interrompues par un mécanisme connu sous le nom de dépression à long terme (DLT) et ce, au profit d'éventuelles nouvelles connexions synaptiques avec d'autres neurones (Wolpert, 2004).

## **2.7 La survie des neurones et l'apoptose**

L'apoptose, un mécanisme de mort cellulaire programmé, est indispensable au bon développement du système nerveux. À la différence de la cellule en nécrose, la cellule apoptotique est éliminée de son environnement tissulaire sans induire de réponse inflammatoire. Dans le développement du SNC, l'apoptose se manifeste tant aux stades embryonnaire et fœtal que postnatal et s'avère déterminante dans la régulation du nombre de neurones et de cellules gliales et par le fait même, de l'architecture et de l'organisation du cerveau (de Graaf-Peters et Hadders-Algra, 2006 ; Rice et Barone, 2000). En fait, c'est près de la moitié des neurones produits au cours du développement du SNC qui sera éliminée et ceci affectera tous les types de neurones (Lossi et Merighi, 2003). La première vague apoptotique a lieu dès le début de la neurogénèse dans les zones prolifératives (i.e. ventriculaires) et touche les précurseurs neuronaux de même que les jeunes neuroblastes. La seconde vague vise les cellules post-mitotiques, aussi bien neuronales que gliales, au cours de leur différenciation terminale et durant la synaptogénèse (Lossi et Gambino, 2008).



Le contrôle de la survie ou de la mort des neurones (et des cellules gliales) repose sur la compétition pour les facteurs de croissance de la famille des neurotrophines tels le facteur de croissance des nerfs (NGF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et les neurotrophines 3 et 4/5, qui sont indispensables pour la survie des neurones. Ainsi, la survie des cellules est intimement liée à la disponibilité dans le milieu environnant de ces facteurs. Malgré qu'il y aura une production titanesque de neurones au cours du développement, plusieurs d'entre eux viendront à manquer de ces facteurs et ils seront dès lors éliminés par apoptose (Lossi et Merighi, 2003). En plus de contribuer à la sélection des populations de neurones, les neurotrophines assurent la stabilisation sélective des synapses (de Graaf-Peters et Hadders-Algra, 2006). Il est important de souligner que les facteurs neurotrophiques sont aussi essentiels pour le cerveau adulte. À cet égard, certaines hormones stéroïdiennes et d'autres facteurs de croissance qui passent la barrière sang-cerveau, comme le facteur de croissance lié à l'insuline-I (IGF-I) et le facteur de croissance fibroblastique-2 (FGF-2), sont des régulateurs de la survie cellulaire dans le SNC adulte (Lossi et Merighi, 2003).

## **2.8 Les principaux neurotransmetteurs du SNC**

Les neurotransmetteurs et neuromodulateurs jouent un rôle capital dans le développement et le fonctionnement du système nerveux. En induisant des influx nerveux excitateurs ou inhibiteurs qui agissent sur le potentiel membranaire (i.e. actions de dépolarisation ou d'hyperpolarisation), ils influencent notamment la migration et la différenciation neuronales, et contribuent particulièrement à l'élaboration des connexions synaptiques et à la régulation des neurotransmetteurs (de Graaf-Peters et Hadders-Algra, 2006 ; Rho et Storey, 2001). À ce jour, on dénombre plusieurs dizaines de neurotransmetteurs (neurotransmetteurs de petite taille et neuropeptides confondus). Dans cette section, nous n'aborderons que les principaux neurotransmetteurs, en portant une attention particulière à ceux retrouvés et qui agissent dans le SNC. Plusieurs de ces neurotransmetteurs ont été détectés dans le modèle cellulaire P19 (section 4.1).

Les catécholamines regroupent trois neurotransmetteurs, la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline. Les neurones dopaminergiques qui sécrètent la dopamine sont retrouvés essentiellement dans le mésencéphale, les noyaux gris centraux et l'hypothalamus. La



dopamine est un neurotransmetteur inhibiteur qui agit dans le contrôle du mouvement, l'inhibition de la prolactine (hormone de l'hypophyse) et sur la vasodilatation (Fix, 2006). Les neurones qui synthétisent la noradrénaline, un dérivé métabolique de la dopamine, que l'on retrouve dans le SNC, innervent notamment la moelle épinière, le cervelet, le cortex cérébral et à plus forte concentration l'hypothalamus. La noradrénaline est un neurotransmetteur excitateur davantage localisé dans la matière grise du cerveau que dans la matière blanche (Rho et Storey, 2001). Chez le rat, les neurones noradrénergiques peuvent être détectés tôt au cours de la corticogénèse, soit dès E12, et agissent sur la plasticité du néocortex en développement. Le niveau d'expression de ces neurones augmente après la naissance pour atteindre une valeur maximale à l'âge adulte (environ 6 semaines) (Rho et Storey, 2001). Dans le système nerveux mature, la noradrénaline joue un rôle notamment dans les troubles d'anxiété, l'apprentissage et la mémorisation (Fix, 2006). La noradrénaline est elle-même le précurseur d'un autre neurotransmetteur, l'adrénaline, lequel a toutefois un rôle moindre dans le SNC (comparativement au SNP) (Fix, 2006). Les neurones adrénergiques du SNC ne sont présents que dans quelques groupes de neurones dans la moelle allongée du tronc cérébral. Leur nombre augmentera progressivement dans les premières semaines post-naissance (2<sup>e</sup>-4<sup>e</sup> semaines) pour atteindre un maximum, après quoi il diminuera (Rho et Storey, 2001).

La sérotonine est un neurotransmetteur distribué dans toutes les régions du SNC, avec une prépondérance dans le cervelet. Ce niveau élevé tendra toutefois à diminuer vers l'âge adulte (de Graaf-Peters et Hadders-Algra, 2006). Les neurones sérotonergiques sont parmi les types neuronaux qui sont présents très tôt dans le développement du système nerveux (E12 chez le rat) et qui influencent la prolifération et la maturation des neurones. Par la suite, les neurones qui contiennent de la sérotonine vont migrer en petits groupes afin de former les noyaux du raphé du tronc cérébral (i.e. structures sous-corticales du cerveau dont le bulbe rachidien, le pont et le mésencéphale), après quoi ils se projettent de manière extensive sur l'ensemble du SNC. Ils exercent des actions régulatrices sur le sommeil, la thermorégulation, la douleur, l'anxiété et le contrôle moteur, et peuvent induire des PLT et des DLT dépendamment du type de récepteurs à la sérotonine présents à la membrane post-synaptique et du stade de développement (Fix, 2006 ; Rho et Storey, 2001).

L'acétylcholine est le principal neurotransmetteur excitateur du SNP. Ce neurotransmetteur est également exprimé dans le SNC, notamment dans les noyaux moteurs somatiques et viscéraux du tronc cérébral et de la moelle épinière ainsi que dans le noyau basal de Meynert situé dans le télencéphale (Fix, 2006). On distingue deux types de neurones acétylcholinergiques : muscarinique et nicotinique. Les neurones muscariniques sont ceux retrouvés majoritairement dans le SNC et peuvent à la fois déclencher des influx nerveux excitateurs et inhibiteurs. Chez la souris, ces neurones peuvent être détectés dès E18 dans plusieurs régions du cerveau telles le néocortex, l'hippocampe et le cervelet. Le niveau d'expression augmente dans la première semaine post-naissance, puis redescend à des niveaux moins élevés qui demeureront stables. Les neurones muscariniques jouent un rôle dans la croissance axonale, la différenciation neuronale, la synaptogénèse et la plasticité synaptique. Les neurones nicotiniques, exprimés tant dans le SNC que le SNP, agissent notamment dans les processus de mémorisation à court terme et d'induction de l'effet analgésiant. Également, plusieurs évidences indiquent que ces neurones agissent au niveau des terminaisons pré-synaptiques en régulant la sécrétion de d'autres neurotransmetteurs (Rho et Storey, 2001).

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le cortex cérébral. Ces neurones GABAergiques proviennent des éminences ganglionnaires et migreront de manière tangentielle au cours de la corticogénèse pour coloniser le cortex (de Graaf-Peters et Hadders-Algra, 2006). Il est intéressant de noter que ce neurotransmetteur inhibiteur agit d'abord comme excitateur tôt durant le neurodéveloppement. Il est détecté dès E13 dans le bulbe olfactif, le néocortex et le cervelet, ce dernier présentant des niveaux de GABA deux à trois fois plus élevés comparativement à ceux du glutamate ou l'aspartate, deux acides aminés qui agissent aussi comme neurotransmetteurs dans le SNC (Benitez-Diaz *et al.*, 2003 ; Miranda-Contreras *et al.*, 1999 ; Miranda-Contreras *et al.*, 2000). Durant cette période, les récepteurs du GABA agissent de la même façon que les récepteurs glutamatergiques de l'AMPA (acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionique), soit de manière synergique avec les récepteurs glutamatergiques du NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Le changement de fonctionnement du GABA (i.e. excitateur à inhibiteur) survient peu après la naissance, entre les jours P2 et P7 chez le rat. (de Graaf-Peters et Hadders-Algra,

2006). La production de GABA augmentera progressivement dans le cortex jusqu'à l'âge adulte (Benitez-Diaz *et al.*, 2003).

Le glutamate constitue le neurotransmetteur excitateur le plus important du SNC. Au cours du développement embryonnaire du cortex, les neurones glutamatergiques vont se projeter sur le striatum, le noyau sous-thalamique et le thalamus. Il est le neurotransmetteur des neurones granulaires du cervelet, des fibres afférentes primaires et nociceptives de la moelle épinière et du tronc cérébral et des neurones pyramidaux du cortex. Quant à l'aspartate, il est particulièrement retrouvé dans les fibres grimpantes du cervelet. Le glutamate et l'aspartate activent les récepteurs à canaux ioniques pour l'AMPA et le NMDA, lesquels sont souvent co-localisés au niveau de la membrane, de même que le récepteur du kaïnate (Fix, 2006). Dans le néocortex chez la souris, le glutamate et l'aspartate sont exprimés dès E13 et leurs niveaux vont graduellement augmenter après la naissance jusqu'au stade de jeune adulte chez la souris. Il est proposé que ces neurotransmetteurs aient une influence neurotrophique durant la corticogénèse (Benitez-Diaz *et al.*, 2003). Dans la moelle épinière, le glutamate est détecté dès E12, suivi d'un plateau d'expression maximale entre E16 et P3, une période qui coïncide avec une forte synaptogénèse (Miranda-Contreras *et al.*, 2002). Dans le cerveau adulte, l'activation des récepteurs AMPA et NMDA par le glutamate et l'aspartate permet d'induire des phénomènes de PLT nécessaires aux processus d'apprentissage et de mémorisation (Fix, 2006).

Une autre famille de neurotransmetteurs importante dans le SNC est celle des peptides opiacés, une catégorie qui regroupe les endorphines, encéphalines et dynorphines. Les endorphines sont retrouvées exclusivement dans l'hypothalamus. Ce sont de puissants analgésiques (Fix, 2006). La  $\beta$ -endorphine, la forme la plus répandue dans le cerveau, peut être détectée dès E11.5 dans le SNC chez la souris et augmentera progressivement en quantité durant la corticogénèse (Rius, Chikuma et Loh, 1991). Les encéphalines constituent la classe de peptides opiacés la plus abondante et la plus répandue, avec une plus forte concentration dans le globus pallidus, une structure sous-corticale du télencéphale. On retrouve les encéphalines en concomitance avec la dopamine, le GABA, la noradrénaline et l'acétylcholine. Localisées dans les neurones GABAergiques du globus pallidus, elles

interviennent dans la suppression de la douleur. Les dynorphines sont distribuées de la même manière que les encéphalines. Elles agissent notamment sur la modulation de la neurotransmission des circuits neuronaux, ce qui ultimement aura des impacts sur l'apprentissage, la mémorisation, l'humeur, la motivation et les fonctions cognitives (Tejeda, Shippenberg et Henriksson, 2012). Elles sont également présentes tôt durant le développement embryonnaire du SNC, en assumant comme première fonction de participer au bon développement de l'hypothalamus (Szeto, 2003).

Enfin, la substance P et la somatostatine sont deux neuropeptides non-opiacés exprimés dans le SNC. La substance P se retrouve à forte concentration dans la substance noire mais aussi dans les ganglions des racines dorsales. Elle a des rôles notamment dans la transmission de la douleur et le contrôle du mouvement (Fix, 2006). Elle module également la neurotransmission de d'autres neurotransmetteurs, particulièrement ceux du système acétylcholinergique (Berner *et al.*, 2008). Au niveau développemental, la substance P est exprimée tôt dans le SNC (à partir de E14.5) et participe au développement de plusieurs structures de l'encéphale et la moelle épinière (MacKenzie et Quinn, 2002). Les neurones qui expriment la somatostatine permettent notamment de contrôler la libération de l'hormone de croissance sécrétée par l'hypophyse ainsi que l'hormone thyroïdienne produite par l'hypothalamus (Fix, 2006). En plus de ses fonctions de régulation de l'expression d'hormones et de ses impacts au niveau des fonctions motrices et cognitives dans le cerveau adulte, la somatostatine joue un rôle déterminant durant le développement embryonnaire du SNC. Exprimée dès E12 chez le rat et ce, dans plusieurs régions du cerveau, elle est impliquée dans la migration neuronale et la croissance axonale (Le Verche *et al.*, 2009).

## CHAPITRE III : RÉGULATEURS DE LA NEUROMIGRATION

Cette thèse s'intéresse aux mécanismes de l'action agrégative de la CP sur les neurones P19, un modèle qui sera décrit plus loin (section 4.1). Afin de mieux orienter nos efforts dans l'identification de ces mécanismes, nous avons considéré les différentes étapes du développement neuronal afin d'identifier l'étape à laquelle pourrait le mieux s'apparenter l'action de la CP. Les neurones P19 étant post-mitotiques lors de leur traitement avec la CP, nous avons abandonné l'idée d'une action possible de la CP sur les processus de prolifération et de différenciation neuronales dans le modèle P19. Les neurones P19 nouvellement différenciés sont de jeunes neurones qui n'ont pas encore réalisé la spécialisation des neurites en axones ou dendrites (MacPherson et Mc Burney, 1995 ; McBurney *et al.*, 1988), ce qui nous fait penser que les mécanismes de la synaptogénèse ne sont pas encore en branle. Le processus de migration neuronale, qui précède la synaptogénèse, a ainsi retenu notre attention. Des travaux de l'équipe du Dr Samuel David vont dans le sens d'un rôle de la CP dans cette étape développementale. En effet, ils ont montré qu'un anticorps anti-CP bloquait la migration neuronale dans des cultures de tranches de cervelet (Mittal et David, 1994b). Nous nous sommes donc inspirés du savoir sur le processus de neuromigration et nous avons relevé dans la littérature quelques modulateurs/régulateurs importants, à commencer par la reeline. Nous tenons à souligner que nous n'écartons pas un rôle possible de la CP dans la prolifération et la différenciation neuronales, ni un rôle dans la synaptogénèse. De tels rôles pourraient être mis en évidence à l'aide d'autres modèles neuronaux ou d'autres calendriers de traitement avec la CP.

### 3.1 La reeline

#### 3.1.1 Structure de la reeline

La reeline est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire composée d'environ 3500 acides aminés et dont le poids moléculaire est approximativement de 400-450 kDa (Lacor *et al.*, 2000). Il est proposé que cette variation de la taille de la reeline puisse indiquer divers

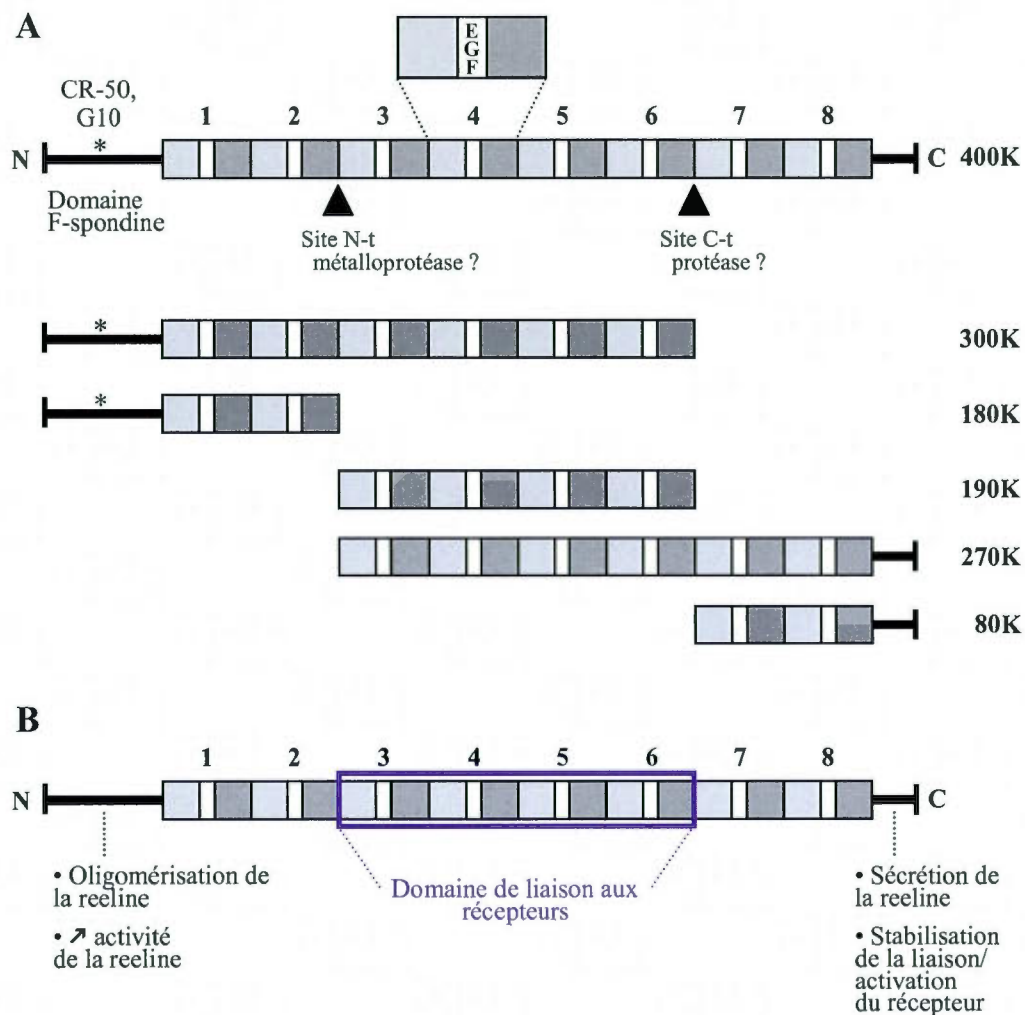
degrés de glycosylation (Tissir et Goffinet, 2003). La reeline est exprimée et sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius, localisées dans la zone marginale du cortex cérébral en développement (Zhao *et al.*, 2004). Elle est également exprimée dans le cervelet par une sous-population de neurones glutamatergiques situés dans les couches granulaires (Lacor *et al.*, 2000 ; Scotti et Herrmann, 2002). La structure de la reeline (fig. 3.1) comporte trois principales sections. La section N-t contient une séquence ayant près de 25 % d'homologie avec celle d'un motif de la protéine F-spondine. La section suivante de la reeline est constituée de huit répétitions d'un même domaine renfermant un motif retrouvé dans le facteur de croissance épithélial (EGF) (Fatemi, 2005a ; Knuesel, 2010 ; Panteri, Paiardini et Keller, 2006). La section C-t est quant à elle composée d'une courte séquence hautement basique de trente trois acides aminés (Fatemi, 2005b).

*In vivo*, la reeline est clivée à deux sites préférentiels, le premier localisé entre les domaines 2 et 3 (site N-t) et le second situé entre les domaines 6 et 7 (site C-t), ce qui permet de générer cinq fragments distincts. L'anticorps anti-reeline G10, qui reconnaît un épitope N-terminal, permet de détecter la forme native (400 kDa) de même que les fragments de 300 kDa et 180 kDa de la reeline (Jossin *et al.*, 2003). Des études indiquent que le clivage au site N-t de la reeline pourrait dépendre d'une métalloprotéase dont le cœur catalytique comprend un atome de zinc (Jossin, Gui et Goffinet, 2007 ; Lambert de Rouvroit *et al.*, 1999). Plus récemment, il a été montré que cette métalloprotéase serait activée par une protéase à sérine de la famille des convertases et qu'elle présente une forte affinité pour l'héparine, une molécule faisant partie de la famille des glycosaminoglycanes et capable d'activer des inhibiteurs naturels de protéases à sérine (Kohn *et al.*, 2009a). Alors que certains indices s'accumulent quant aux caractéristiques de la protéase qui agit au site N-t, rien n'est encore connu sur la protéase qui agit au site C-t. De plus, rien n'est encore connu sur l'identité des acides aminés reconnus par les protéases aux sites N-t et C-t, ni sur les fonctions biologiques reliés aux différents fragments de la reeline (Knuesel, 2010 ; Zhao et Frotscher, 2010).

### 3.1.2 Rôles associés à la reeline

La reeline joue un rôle important dans la migration neuronale et la croissance des neurites pour le développement des structures laminaires du cortex, de l'hippocampe et du cervelet.



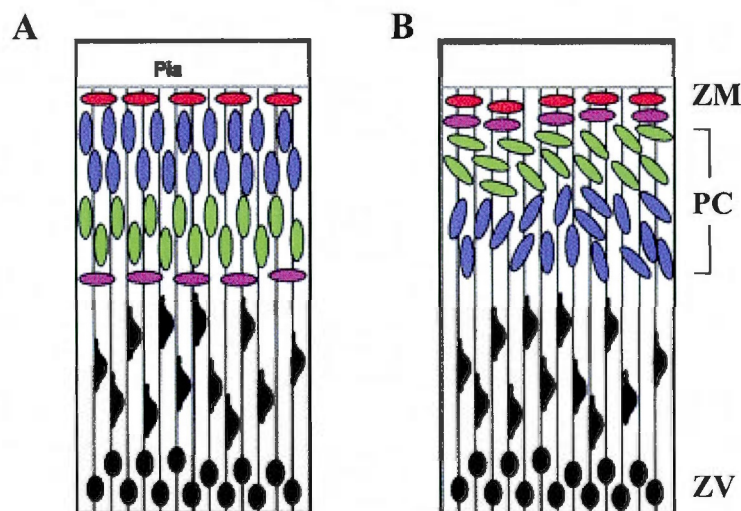


**Figure 3.1 Structure, fragments et domaines fonctionnels de la reeline.** **A** La structure de la reeline comporte principalement un domaine F-spondine en position N-terminale, suivi des huit domaines répétés renfermant un motif retrouvé dans le facteur de croissance épithéliale (EGF). Deux sites de clivage (▲) préférentiels, sites N-t et C-t, sont localisés après les domaines 2 et 6 respectivement. Les anticorps CR-50 et G10 fréquemment utilisés sont dirigés contre un épitope N-terminal (\*). Le clivage protéolytique de la reeline, par des protéases qui ne sont pas encore identifiées à ce jour, permet d'obtenir 5 fragments différents de la reeline. **B** Les rôles des différents domaines de la reeline identifiés jusqu'à présent sont indiqués. Figure inspirée de Knuesel (2010) et Panteri *et al* (2006).

Le rôle de première instance de la reeline dans l'organisation neuronale du cortex a été mis en évidence à partir d'un modèle de souris *reeler*, une souche de souris décrite pour la première fois en 1951 par le Dr Falconier (Frotscher, 1998). Ces souris présentent une

mutation autosomale récessive sur le gène codant pour la reeline situé sur le chromosome 5, ce qui rend la protéine inopérante (Fatemi *et al.*, 2005). L'examen histologique du cortex des souris *reeler* montre une défectuosité dans l'organisation laminaire du cortex, un positionnement anormal des neurones, une mauvaise orientation des fibres nerveuses et une hypoplasie cérébrale (Fatemi *et al.*, 2005 ; Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001). On dénote également des défauts d'organisation structurelle des neurones de l'hippocampe, du cervelet (*e.g.* les cellules de Purkinje) et d'autres structures subcorticales telles le bulbe olfactif (Goffinet *et al.*, 1999 ; Ogawa *et al.*, 1995). Malgré ces malformations développementales, ces souris sont viables à long terme mais présentent notamment des déficits de coordination motrice (Frotscher, 1998). De plus, une étude rapporte que ces souris ont une diminution, qui s'accroît avec l'âge, de l'induction du réflexe de sursaut déclenché par un stimulus auditif ou tactile (*i.e.* induction d'un PPI), un phénomène aussi observé chez les personnes schizophrènes et autistes (Fatemi, 2005b ; Tueting *et al.*, 1999).

Au niveau de l'architecture du cerveau, les défauts qui résultent d'une absence de reeline (phénotype *reeler*) se traduisent par une inversion de l'ordre des couches neuronales du cortex. Il a été mentionné précédemment qu'au cours de la migration neuronale dans le cortex embryonnaire, les couches de neurones s'organisent selon un gradient de l'intérieur vers l'extérieur, c'est-à-dire que les premiers neurones à coloniser le cortex forment la couche neuronale la plus interne, alors que les neurones générés plus tardivement occupent les couches de plus en plus superficielles du cortex (voir section 2.4). Chez les souris *reeler*, les cohortes de neurones tardives ne réussissent pas à franchir la couche de neurones plus précoce, ce qui entraîne un empilement inversé des neurones (fig. 3.2). Ainsi, la maturation de la zone laminaire du cortex se fait de l'extérieur vers l'intérieur (Tissir, Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2002). Il est également à noter que les couches neuronales sont moins compactes et moins bien définies que dans un cortex sain. Au niveau zoologique, on retrouve un gradient de l'extérieur vers l'intérieur dans le cortex des reptiliens tels que la tortue et le lézard, de même que chez le poulet. Ainsi, une hypothèse veut que l'organisation laminaire du cortex de l'intérieur vers l'extérieur retrouvée chez les mammifères soit une acquisition issue de l'évolution de l'organisation du cerveau chez les espèces animales plus complexes (Tissir, Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2002).



**Figure 3.2 Schéma de l'organisation des couches neuronales du cortex.** **A** Phénotype normal. Les neurones migrent et forment des couches ordonnées selon un gradient de l'intérieur vers l'extérieur dans la plaque corticale (PC). **B** Phénotype *reeler*. Au début de la corticogénèse, les neurones destinés à former la sous-plaque corticale (cellules en rose) migrent normalement pour rejoindre les cellules de Cajal-Retzius de la zone marginale (ZM) (cellules en rouge). Toutefois, les neurones post-mitotiques subséquents ne parviennent pas à traverser la pré-plaque (cellules vertes et bleues); ils s'empilent de manière inversée dans la PC, selon un gradient de l'extérieur vers l'intérieur. De plus, ces neurones sont mal-orientés. Figure adaptée de Lambert de Rouvroit et Goffinet (2001).

Il n'y a pas que chez les souris *reeler* que l'on observe des défauts organisationnels des neurones du cortex. Il a été démontré par des études histologiques que les souris qui n'expriment pas le récepteur de l'apolipoprotéine E de type 2 (ApoER2) (*ApoER2*<sup>-/-</sup>), le récepteur de lipoprotéines de très faible densité (VLDLr) (*VLDLr*<sup>-/-</sup>), ou encore la protéine adaptatrice Disabled-1 (Dab-1) (e.g. souris *scrambler* et *yotari*), ont tous des défauts de lamination corticale qui s'avèrent très similaires à ceux du phénotype *reeler* (Sheldon *et al.*, 1997 ; Trommsdorff *et al.*, 1999).

Comme il a été mentionné précédemment, la reeline est connue pour interagir spécifiquement avec des récepteurs présents à la surface neuronale tels ApoER2, VLDLr et  $\alpha_3\beta_1$ -intégrine. L'activation par la reeline de l'un ou l'autre de ces récepteurs mène chaque fois à la phosphorylation de Dab-1, qui à son tour, induit différentes cascades d'activation

moléculaire impliquées dans l'organisation et la migration des neurones (Fatemi, 2005b). Ces cascades seront abordées dans la prochaine section (section 3.1.3). Quant à savoir si la reeline agit comme signal qui induit ou inhibe la migration neuronale, ou encore si elle a des propriétés de chimio-attraction/répulsion, la question demeure d'actualité (Zhao et Frotscher, 2010).

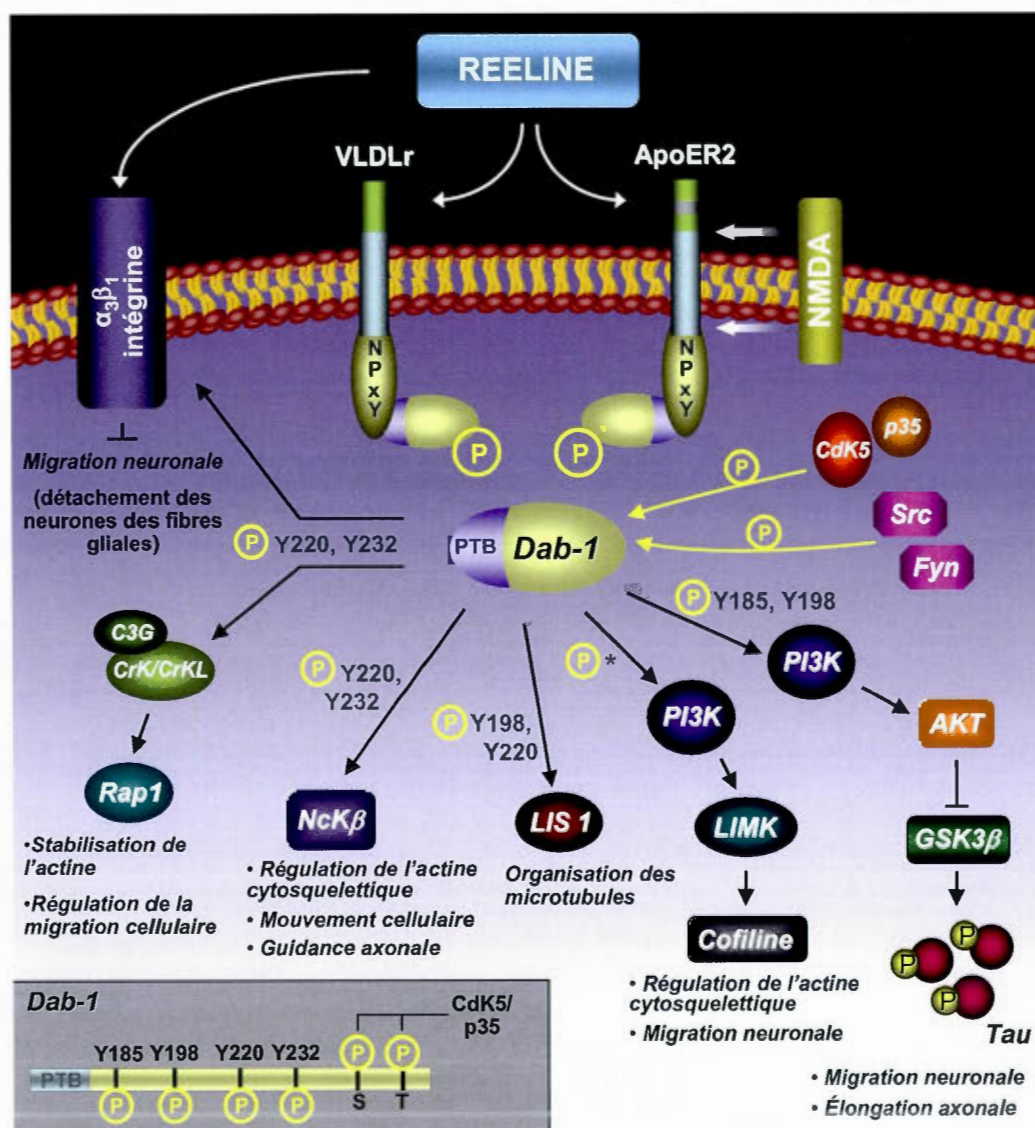
Il n'y a pas que dans le cerveau en développement que la reeline peut intervenir. Les recherches au cours des dernières années indiquent que la reeline joue un rôle crucial dans le cerveau adulte, principalement dans la neurotransmission. Alors que la reeline est produite abondamment par les cellules de Cajal-Retzius au cours du développement du cerveau et que ces cellules disparaissent complètement lorsque prend fin la phase de migration neuronale, l'expression de la reeline dans le cerveau adulte est assurée par les neurones GABAergiques issus des éminences ganglioniques (Lavdas *et al.*, 1999). À ce jour, la reeline est connue dans le cerveau adulte pour moduler la plasticité synaptique, ainsi que favoriser la mémoire à long terme et les processus d'apprentissage (Herz et Chen, 2006).

### **3.1.3 Mécanismes d'action de la reeline**

#### **a) Voies signalisatrices**

Les mécanismes d'action de la reeline ne sont pas complètement connus. Les travaux ont surtout mis en lumière les étapes précoces de ces mécanismes. Ceux-ci sont schématisés dans la figure 3.3. La reeline peut interagir spécifiquement avec des récepteurs présents à la surface neuronale, soient ApoER2, VLDLr et le récepteur  $\alpha_3\beta_1$ -intégrine (D'Arcangelo *et al.*, 1999 ; Fatemi, 2005b ; Hiesberger *et al.*, 1999). Les récepteurs ApoER2 et VLDLr possèdent chacun une séquence en acides aminés dans la partie intracellulaire comprenant une tyrosine (Tyr) non-phosphorylable (motif NPxY) et, suivant l'activation du récepteur, ce motif permettra le recrutement de la protéine adaptatrice Dab-1 via le domaine de liaison à une tyrosine phosphorylée (PTB) de Dab-1 (Forster *et al.*, 2006). Suivant cette interaction, Dab-1 sera dès lors phosphorylée (Trommsdorff *et al.*, 1999). Les protéines Fyn et Src, toutes deux appartenant à la famille des tyrosine-kinases, sont impliquées dans la phosphorylation de





**Figure 3.3 Les voies de signalisation de la reeline.** La reeline peut lier les récepteurs de l'apolipoprotéine E de type 2 (ApoER2), le récepteur lipoprotéique de très faible densité (VLDLR) et le récepteur  $\alpha_3\beta_1$ -intégrine. Ces récepteurs possèdent une séquence en acides aminés dans la partie intracellulaire comprenant une tyrosine (Y) non-phosphorylable (N<sub>x</sub>PY) qui permet d'interagir avec le domaine PTB de la protéine adaptatrice Dab-1. Dab-1 possède six sites de phosphorylations distincts (Y185, Y198, Y220, Y232, une sérine (S) et une thréonine (T)). Selon la combinaison des résidus phosphorylés, phospho-Dab-1 relayera le signal à travers diverses cascades de signalisation intracellulaire qui agiront sur l'organisation des neurones. Les kinases Fyn et Src sont impliquées dans la phosphorylation de Dab-1. Dans le cerveau adulte, la reeline agit sur l'activité des récepteurs NMDA via la liaison au récepteur ApoER2. \* Site(s) de phosphorylation non-confirmé(s). Figure inspirée de Assadi *et al.* (2003), Fatemi (2005), Chai *et al.* (2009) et Knuesel (2010).

Dab-1 (Jossin *et al.*, 2004). Dab-1 possède quatre résidus de Tyr qui peuvent être phosphorylés (Tyr 185, 198, 220, 232) (Knuesel, 2010) et dépendamment des combinaisons des résidus phosphorylés, phospho-Dab-1 relayera le signal à travers diverses cascades de signalisation intracellulaire qui agiront sur l'organisation des neurones (Fatemi *et al.*, 2005 ; Maurin *et al.*, 2004). Il est à noter que Dab-1 possède deux autres sites de phosphorylation près de son extrémité C-t, soit une Ser et une thréonine (Thr), qui sont phosphorylées par une voie de signalisation indépendante de la reeline mais dépendante de CdK5/p35 (Forster *et al.*, 2006).

Parmi les voies importantes gouvernées par Dab-1 se retrouve celle impliquant la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) et la protéine kinase B (AKT) (PI3K/AKT), laquelle est induite lorsque Dab-1 est phosphorylée sur les Tyr 185 et 198, et conduit à l'inhibition de la glycogène-synthase-kinase-3 (GSK3 $\beta$ ). La kinase GSK3 $\beta$  est responsable de la phosphorylation de la protéine stabilisatrice des microtubules Tau (Hiesberger *et al.*, 1999 ; Knuesel, 2010). Lorsque Dab-1 est phosphorylée sur les Tyr 220 et 232, elle recrute le complexe formé de Crk/CrkL et C3G qui à son tour active Rap1, une GTPase qui agit dans la stabilisation de l'actine cytosquelettique (Ballif *et al.*, 2004 ; Knuesel, 2010). Cette voie est impliquée dans la coordination des étapes de la migration neuronale durant le développement du cerveau. Il est également rapporté que l'activation de Dab-1 par la phosphorylation des Tyr 220 et 232 conduit à une modulation des niveaux d'expression de la sous-unité  $\alpha_3$ -intégrine à la surface cellulaire, ce qui ultimement modifie les propriétés adhésives des neurones migratoires (Sanada, Gupta et Tsai, 2004). Dab-1 peut aussi activer la protéine adaptatrice Nck $\beta$  impliquée dans la régulation de l'actine cytosquelettique, les mouvements cellulaires et la guidance axonale. Finalement, lorsque Dab-1 est phosphorylée sur les Tyr 198 et 220, elle peut interagir avec LIS1 (*lissencephaly 1*), une protéine clé de l'arrangement des microtubules au cours de la migration neuronale et de la lamination du cortex (Assadi *et al.*, 2003 ; Knuesel, 2010). Toutes les cibles de la reeline ne sont pas connues. La cofiline, une protéine régulatrice de l'organisation du cytosquelette d'actine compte depuis peu parmi les cibles et impliquerait l'intervention de PI3K. La cofiline sera abordée un peu plus loin.



Dans le cerveau adulte, il a été montré que la reeline agit sur l'activité des récepteurs NMDA et AMPA via la liaison au récepteur ApoER2 et dans une moindre mesure VLDLr (Forster *et al.*, 2010 ; Herz et Chen, 2006). ApoER2 est particulièrement présent dans la région post-synaptique des synapses excitatrices, où il forme un complexe fonctionnel avec le récepteur NMDA via des interactions à la fois intra- et extracellulaire (Herz et Chen, 2006). Ainsi, l'activation d'ApoER2 via la reeline active à son tour le récepteur NMDA, ce qui favorise le déclenchement de PLT (Forster *et al.*, 2006). Cette action de la reeline nécessite l'intervention de Dab-1 et de kinases de la famille Src, qui permettent d'induire la phosphorylation de la sous-unité NR2 du récepteur NMDA afin d'ouvrir le canal et permettre l'entrée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Forster *et al.*, 2010 ; Herz et Chen, 2006). Considérant qu'une dérégulation de l'activation des récepteurs ApoER2 et NMDA est associée à l'émergence de maladies neurologiques telles l'Alzheimer, les évidences indiquant que la reeline contrôle l'activité de ces récepteurs suggèrent qu'il existe des liens entre de telles maladies du cerveau et les fonctions de la reeline dans le cerveau adulte (Herz et Chen, 2006).

#### **b) La cofiline : une cible distale de l'action de la reeline**

Récemment, l'équipe du Dr Michael Frotscher a mis en évidence l'existence d'un lien entre la reeline et la régulation de l'actine cytosquelettique via la phosphorylation de la protéine n-cofiline (Chai *et al.*, 2009b). La cofiline est une des nombreuses protéines associées à l'actine et qui a pour fonction de réguler la polymérisation (i.e assemblage) et la dépolymérisation (i.e. désassemblage) des filaments d'actine (Zhao et Frotscher, 2010). La cofiline est exprimée de manière ubiquitaire dans l'organisme et il existe la forme n-cofiline (*non-muscular cofilin*) qui est spécifiquement exprimée dans les neurones. L'activité de la n-cofiline est contrôlée par la kinase LIM (LIMK) (Arber *et al.*, 1998). À l'état non-phosphorylée, la n-cofiline est active et peut alors désassembler l'actine filamentueuse (f-actine) pour générer de l'actine soluble (i.e. de l'actine globulaire; g-actine). Lorsque la n-cofiline est phosphorylée sur la Ser 3, elle devient inactive et ne peut plus dégrader la f-actine, ce qui conséquemment favorise l'assemblage de l'actine et du même coup, la stabilisation du cytosquelette. La régulation de la stabilisation du cytosquelette revêt d'une grande importance dans les processus de polarisation et de migration des cellules (Forster *et al.*, 2010).

Les travaux de Chai et ses collègues (2009) ont montré par immunohistochimie que la n-cofiline phosphorylée est fortement exprimée et co-localisée avec la reeline dans la zone marginale du cortex embryonnaire (E17.5) de souris. À partir de lysats corticaux d'embryons de souris (E18), il a été montré que le niveau de phospho-n-cofiline est beaucoup plus faible chez les mutants *reeler*, comparativement aux souris de type sauvage. Finalement, l'ajout de reeline recombinante sur des cultures de neurones corticaux embryonnaires de souris *reeler* permet d'augmenter significativement le niveau de phospho-n-cofiline et ce, via la voie connue de la signalisation de la reeline (i.e. le récepteur ApoER2 et l'activation de Dab-1) et par l'intermédiaire de LIMK (Chai *et al.*, 2009a, 2009b). Ces chercheurs postulent que la stabilisation de l'actine filamenteuse, par le biais de la reeline qui induit la phosphorylation de la n-cofiline, permettrait l'ancrage et la terminaison de la migration des neurones dans la zone marginale du cortex en développement (Frotscher *et al.*, 2009).

### c) Fonctions de différents domaines structuraux de la reeline

On commence à collectionner des informations concernant le rôle des divers domaines de la reeline. Les travaux de l'équipe du Dr Goffinet ont montré que la partie centrale de la reeline, comprenant au minimum les domaines 3 à 6 (inclusivement), est nécessaire et suffisante pour la liaison à ses récepteurs et leur activation (Jossin *et al.*, 2004) (fig. 3.1). Bien que la partie N-terminale de la reeline ne soit pas nécessaire pour la liaison aux récepteurs, elle a tout de même un rôle non négligeable dans ce processus comme l'ont montré des études utilisant un anticorps dirigé contre cette partie de la protéine, le CR-50 (Ogawa *et al.*, 1995). Lorsque cet anticorps se lie à la reeline, il empêche l'interaction de la reeline avec ses récepteurs, possiblement de manière stérique, ce qui conduit à une inhibition de la phosphorylation de Dab-1 et bloque le mécanisme d'action de la reeline (Jossin *et al.*, 2003). On peut imaginer que des facteurs cellulaires se liant à la région N-t de la reeline pourraient réguler l'action de la reeline. On ne sait pas encore s'il existe de tels facteurs. D'autre part, il a été montré tant *in vitro* qu'*in vivo* que la partie N-t de la reeline permet la formation d'oligomères de reeline via des interactions électrostatiques, et ces oligomères favoriseraient une meilleure activation des récepteurs et de Dab-1 comparativement aux monomères de reeline (Utsunomiya-Tate *et al.*, 2000). Les complexes reeline-reeline peuvent

être inhibés par la présence de l'anticorps CR-50, réduisant du même coup la liaison aux récepteurs et la phosphorylation de Dab-1 (D'Arcangelo *et al.*, 1999 ; Utsunomiya-Tate *et al.*, 2000). Ainsi, l'anticorps CR-50 s'avère un outil expérimental fort intéressant dans l'investigation des fonctions biologiques de la reeline.

Des études effectuées à partir d'embryons de souris mutantes qui expriment une reeline dépourvue de la portion C-t (souris *Orleans*) ont montré que la protéine ainsi tronquée n'est plus sécrétée par les neurones corticaux et tend plutôt à s'accumuler dans le réticulum endoplasmique de ces cellules (de Bergeyck *et al.*, 1997 ; Derer, Derer et Goffinet, 2001). Les auteurs de ces études stipulent que la portion C-t de la reeline est importante pour la sécrétion de la protéine. Cette hypothèse est actuellement controversée. D'autres études ont montré que la portion C-terminale de la reeline est importante pour l'induction de la phosphorylation de Dab-1 (Kohno *et al.*, 2009b ; Nakano *et al.*, 2007). En utilisant une reeline recombinante dépourvue de la partie C-t, ils ont montré que cette reeline perdait la capacité de lier ses récepteurs, résultant en une diminution de la phosphorylation de Dab-1. Les auteurs ont suggéré l'implication possible d'un co-récepteur capable de lier la portion C-t de la reeline et de stabiliser la liaison, permettant ainsi une meilleure activation de Dab-1.

#### **d) Activité protéolytique de la reeline**

La reeline est une protéase à sérine qui, de par son activité protéolytique, permet le clivage de différents substrats de la matrice extracellulaire et/ou la digestion de la matrice extracellulaire. À titre d'exemple, il a été montré par des essais *in vitro* que la reeline peut dégrader rapidement la fibronectine et la laminine, ainsi que dans une moindre mesure le collagène de type IV. Ainsi, il est plausible que la reeline puisse avoir un rôle de modulateur de la lame basale *in vivo*, facilitant ainsi le déplacement et l'ancrage des neurones migratoires dans la plaque corticale en développement, ce qui ferait de la reeline un facteur permissif pour la migration neuronale (Quattrocchi *et al.*, 2002). De plus, il est rapporté que la dégradation de la fibronectine par la reeline peut être inhibée par des inhibiteurs de protéases à sérine ou encore au moyen de l'anticorps CR-50 (Quattrocchi *et al.*, 2002). Il est proposé que cette activité protéolytique de la reeline favoriserait le mouvement des neurones lors de la migration neuronale. D'autre part, il a également été montré que l'activité protéolytique

intrinsèque associée à la reeline permet de moduler la maturation synaptique au niveau des jonctions neuromusculaires (Quattrocchi *et al.*, 2003).

#### **e) Influences pro- et anti-migration de la reeline**

Il n'est pas encore clairement établi dans quelle mesure la reeline stimule ou inhibe la migration neuronale. Elle pourrait avoir les deux influences selon le contexte : l'expression différentielle d'ApoER2 et VLDLr sur les cellules, les niveaux relatifs des fragments de la reeline, la présence d'autres facteurs trophiques qui moduleraient l'action de la reeline et la composition de la MEC. Évidemment, à cela s'ajoute le facteur temps.

La reeline serait capable de promouvoir la migration neuronale. En effet, des recherches laissent à penser que la reeline se comporte en molécule chimio-attractante pour les neurones migratoires. Parce que la reeline est exprimée par les cellules de Cajal-Retzius situées dans la couche superficielle du cortex en développement, son effet attractif permettrait aux neurones corticaux postmitotiques de traverser la sous-plaque corticale, puis les couches neuronales subséquentes formées plus tôt au cours de la corticogénèse, pour finalement s'établir dans le cortex, en formant des couches neuronales de plus en plus superficielles sous la zone marginale (Zhao et Frotscher, 2010). À cet égard, il est proposé que l'effet attractif de la reeline puisse s'exercer via les fragments de la reeline. Dans cette hypothèse, les fragments de la reeline seraient plus aptes à diffuser à travers le cortex, créant ainsi un gradient depuis la zone marginale vers la zone ventriculaire. Ce gradient permettrait d'attirer les neurones migratoires vers la partie supérieure de la plaque corticale en développement (Jossin, Gui et Goffinet, 2007 ; Tissir et Goffinet, 2003).

D'autres évidences plus directes suggèrent que la reeline promeut la migration neuronale. Une étude réalisée chez les souris *reeler* a montré que lorsque la reeline est exprimée de manière ectopique (sous le contrôle du promoteur de la nestine) par les neurones précurseurs de la zone ventriculaire, elle peut réparer certains défauts neuroanatomiques caractéristiques des souris *reeler* (Magdaleno, Keshvara et Curran, 2002). Qui plus est, l'équipe du Dr Goffinet a montré à partir de cultures de tissus corticaux *reeler* prélevés d'un embryon E13 que l'ajout de reeline permet de stimuler la phosphorylation de Dab-1 et de contrecarrer

partiellement le phénotype *reeler*. Précisément, l'ajout de reeline recombinante à la culture neuronale *reeler* favorise la formation de la préplaque corticale, une étape qui a lieu tôt au cours de la corticogénèse, de même qu'une meilleure organisation de la plaque corticale, de manière comparable à celle des souris sauvages (Jossin *et al.*, 2004).

Certains auteurs rapportent que la reeline serait capable de signaler l'arrêt de la migration des neurones le long des fibres gliales (Hack *et al.*, 2002 ; Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001 ; Tissir et Goffinet, 2003). Dans cet ordre d'idées, il a été proposé que la liaison de la reeline au récepteur  $\alpha_3\beta_1$ -intégrine puisse inhiber la migration neuronale en induisant le détachement des neurones des fibres gliales (Dulabon *et al.*, 2000 ; Schmid *et al.*, 2005). Le mécanisme proposé impliquerait la complexation de Dab-1 à un motif NPxY situé au niveau de la sous-unité  $\beta_1$  de l'intégrine, pour permettre ensuite la phosphorylation de Dab-1. Ce mécanisme demeure toutefois controversé et demande à être davantage étudié. Plus récemment, une étude basée sur l'examen histologique de cortex néonataux de souris *VLDLr*<sup>-/-</sup> rapporte que ce récepteur serait impliqué dans l'inhibition de la migration neuronale. Ainsi, la liaison de la reeline au récepteur VLDLr agirait comme signal d'arrêt de la migration des neurones, empêcherait ceux-ci de migrer au-delà de la zone marginale (Hack *et al.*, 2007).

### 3.1.4 Profil d'expression développemental de la reeline

Contrairement à la CP, plusieurs études ont été réalisées jusqu'à présent afin de tracer un portrait de l'expression de la reeline au cours du développement du cerveau et ce pour diverses espèces animales. Le tableau 3.1 synthétise l'ensemble des études portant sur l'expression de la reeline dans l'ontogénèse du cerveau, tant au cours du développement embryonnaire que post natal. La très grande majorité de ces études porte sur la localisation de l'expression de la reeline dans le cerveau, principalement par l'analyse de l'expression de l'ARNm par la technique d'hybridation *in situ* (HIS) et par analyse de la protéine par immunohistochimie (IH). Essentiellement, l'ensemble de ces études montre que chez la souris, le transcrit de la reeline apparaît dès les premières étapes de la neurulation (voir section 2.2) vers E8. À E10, le transcrit est détecté dans le cerveau antérieur en formation (comprenant le télencéphale et le diencéphale). Le niveau d'expression de l'ARNm croît

graduellement au cours de la période gestative afin de gagner l'ensemble du cortex cérébral (particulièrement dans la couche superficielle contenant les cellules de Cajal-Retzius), le cerveau moyen (comprenant l'hippocampe, le thalamus et l'hypothalamus) et le cervelet, jusqu'à atteindre un maximum d'expression dans les premiers jours suivant la naissance. Par la suite, on dénote une diminution progressive et généralisée du transcrit à travers tout le cerveau et la persistance de faibles niveaux au cours de l'âge adulte, un stade qui débute autour de la 6<sup>e</sup>-7<sup>e</sup> semaine post-naissance chez la souris.

Au cours du développement embryonnaire, l'ARNm de la reeline est exprimé également dans d'autres organes tels que le foie, les reins, la rate, le cœur, les ovaires et les testicules (au plus tôt, dès E12.5). Toutefois, tous les organes qui expriment la reeline, à l'exception du cerveau, se développent normalement au niveau structural même en absence de la reeline, tel que démontré au moyen d'études histologiques de tous ces organes chez les souris *reeler*. (Ikeda et Terashima, 1997). Il est à noter également que les niveaux d'expression d'ARNm de la reeline dans les organes autres que le cerveau sont beaucoup plus faibles. (Hirosune *et al.*, 1995 ; Ikeda et Terashima, 1997).

Peu d'études se sont penchées sur le profil d'expression protéique par immunobuvardage de la reeline, i.e. de sa forme native et ses fragments, au cours du développement du cerveau. De plus, les deux seules études qui l'on fait ne tracent pas nécessairement un portrait global qui inclut à la fois les stades embryonnaire et post-natal. Ainsi, à ce jour, une seule étude montre le profil protéique des différentes formes de la reeline dans le cerveau post-natal en utilisant des extraits totaux de protéines d'hippocampe de souris. En utilisant l'anticorps G10 qui cible un epitope de la région N-t de la reeline, il a été montré que la reeline native de même que ses fragments de 300K et 180K sont présents dès le premier jour de naissance (P0). Leurs niveaux d'expression demeurent stables jusqu'à P7, après quoi il y a diminution des trois formes. Cette décroissance est plus fortement marquée pour la forme native et le fragment de 300K, ce dernier disparaissant quasi-complètement à P21 (Sinagra *et al.*, 2005). Enfin, une récente étude sur le profil protéique de la reeline durant le développement embryonnaire a été menée chez le cochon (Nielsen *et al.*, 2010). L'analyse faite à partir d'extraits corticaux montre la présence constante et marquée du fragment de 180K durant la



gestation, ainsi que d'autres fragments de la reeline de poids moléculaires plus faibles (entre 60 et 150kDa). La forme native et/ou son fragment de 300K sont présents mais dû à la mauvaise qualité des immunodétections, il s'avère difficile de distinguer les deux formes comme de conclure sur leurs variations au cours de la période à l'étude.

Dans l'intérêt d'approfondir les connaissances portant sur les fonctions de la reeline, les raisons qui expliquent le clivage protéolytique de la reeline et les rôles que les fragments peuvent jouer au cours du développement et/ou de la maturation du cerveau, il est impératif que d'autres études soient menées afin de déterminer un profil protéique plus exhaustif de la reeline. Cette thèse avait pour but d'établir ce profil protéique de la reeline au cours du développement embryonnaire et postnatal du cerveau chez la souris.

**Tableau 3.1 Expression de la reeline dans l'ontogénèse du cerveau de mammifères**

ESPÈCE (méthode d'analyse) <sup>d</sup>	Sites <sup>a</sup> (et moments <sup>b</sup> ) d'expression de la reeline		Références <sup>c</sup>
	Période embryonnaire	Période postnatale	
<b>SOURIS</b>			
(HIS)	Plaque neurale <sup>a</sup> (E8.5) Cerveau antérieur (E9.5, E10) Télencéphale (E9.5-P0) Cortex (E11-P0) Striatum (E14-P0) Hippocampe (E12.5-P0) Thalamus et hypothalamus (E13-P0) Bulbe olfactif (E13-P0) Mésencéphale (E12.5) Tectum (E12.5-P0) Cervelet (E12.5-P0) Moelle épinière (E12.5-P0)	Cerveau antérieur (↘P0-P21)  Cortex (↘P0-P21) Striatum (P0-P5) Hippocampe (↘P0-P21)  Bulbe olfactif (↘P0-P21)  Tectum (P0-P5) Cervelet (P0-adulte) Moelle épinière (P0-adulte)	1-5
(IH)	Cortex (E12-E18) Hippocampe (E16) Bulbe olfactif (E16) Cervelet (E16)	Cortex (↘P0-P8)	4, 6, 7
(IB)	<i>Non déterminé</i>	Hippocampe (P0 : 400K ~ 300K ~ 180K) <sup>e</sup> (P21 : 400K et 300K < 180K)	8
<b>RAT</b>			
(HIS & IH)	Cortex (E18) Hippocampe (E18) Bulbe olfactif (E18) Cervelet (E18)	Cortex (↘P0-P15) Hippocampe (↘P0-P15) Bulbe olfactif (P0-P15) Cervelet (P0-P15)	4, 9
(IB)	<i>Non déterminé</i>	<i>Non déterminé</i>	
<b>COCHON<sup>f</sup></b>			
(PCR & IH)	Cortex (E21-E60; ↘E112-E115)	<i>Non déterminé</i>	10
(IB)	Cortex (E28: 180K) (E42-E60: 180K, 300-400K) (E70-E115: ↘180K, 300-400K)	<i>Non déterminé</i>	10
<b>HUMAIN<sup>f</sup></b>			
(IH)	Cortex et bulbe olfactif (↗8 <sup>e</sup> -27 <sup>e</sup> sem; ↘29 <sup>e</sup> -40 <sup>e</sup> sem)	Cerveau (adulte)	4, 6, 11
(IB)	<i>Non déterminé</i>	Cerveau (adulte: 180K, 300K, 400K)	12, 13

<sup>a</sup> Certaines études ont considéré les grandes régions du cerveau (ex : télencéphale, mésencéphale), d'autres, des sites plus restreints (ex : cortex, hippocampe). Les sites sont listés dans l'ordre rostral-caudal de leur lieu de naissance à partir du tube neural (voir fig. 2.4). Notons, toutefois, que la plaque neurale est la structure temporaire précoce qui donne naissance au tube neural.

<sup>b</sup> Exemples de façons de rapporter les informations : (E12-E18) indique que la reeline est exprimée de E12 à E18 et que les études ont généralement analysé au moins un moment intermédiaire entre les deux limites de temps ; (E16) indique que la reeline est exprimée à ce jour-là et que l'étude n'a porté que sur ce seul jour ; ( $\surd$ P0-P8) indique que la reeline est exprimée de P0 à P8 mais de façon décroissante alors que ( $\nearrow$ P0-P8) indique une expression croissante ; (adulte) indique des analyses faites sur des cerveaux adultes sans considération particulière d'âge.

<sup>c</sup> Références : **1** = (Alcantara *et al.*, 1998); **2** = (Hirotsune *et al.*, 1995); **3** = (Ikeda et Terashima, 1997); **4** = (Meyer *et al.*, 2002) ; **5** = (Schiffmann, Bernier et Goffinet, 1997); **6** = (Meyer *et al.*, 1998); **7** = (Ogawa *et al.*, 1995); **8** = (Sinagra *et al.*, 2005); **9** = (Alvarez-Dolado *et al.*, 1999); **10** = (Nielsen *et al.*, 2010); **11** = (Levenson, Qiu et Weeber, 2008); **12** = (Botella-Lopez *et al.*, 2006); **13** = (Fatemi *et al.*, 2005)

<sup>d</sup> HIS, hybridation *in situ*; PCR, réaction de polymérase en chaîne; IH, immunohistochimie; IB, immunobuvardage.

<sup>e</sup> 400K, 300K et 180K sont les poids moléculaires de la reeline native et de ses fragments N-terminaux.

<sup>f</sup> La période autour du 21<sup>e</sup> jour de gestation chez le porc et celle autour de la 7<sup>e</sup>-8<sup>e</sup> semaine de gestation chez l'humain équivalent au point de vue développemental à E12 chez la souris, c'est-à-dire à l'étape de la formation de la préplaque dans le cortex, donc au tout début de la corticogénèse (Meyer *et al.*, 2002).

### 3.1.5 Reeline et désordres neurologiques

Comme mentionné précédemment, il est largement documenté dans la littérature que la reeline est une protéine clé dans l'organisation architecturale du cerveau en développement (Herz et Chen, 2006). D'autre part, plusieurs études ont montré qu'une désorganisation neuronale est étroitement associée à l'émergence de désordres neurologiques tels la schizophrénie, l'autisme, la lissencéphalie et certaines formes d'épilepsie (Guidotti *et al.*, 2000 ; Haas *et al.*, 2002 ; Hong *et al.*, 2000). Ainsi, différents groupes de chercheurs se sont penchés sur les liens entre certains désordres du cerveau et la reeline.

Il a été montré que les niveaux de reeline et de ses isoformes, mesurés dans le sérum sanguin de personnes d'âge adulte, sont altérés dans certaines troubles neuropsychiatriques telles la schizophrénie, la bipolarité et la dépression majeure (Fatemi, Kroll et Stary, 2001). Ainsi, on note une augmentation de près de 50 % de la forme native de la reeline (400K) et de 90 % pour l'isoforme de 300K chez les gens souffrant de schizophrénie, comparativement à une cohorte d'individus témoins qui ne présente aucun de ces troubles. Ces deux formes sont également plus élevées, d'environ 30 %, dans les cas de dépression majeure. À l'opposé, les reeline 400K et 300K sont moins abondantes dans le sérum des individus atteints de bipolarité. Alors que les niveaux de reeline 180K varient peu chez les schizophrènes, ils diminuent significativement de 49 % et 29 % respectivement dans les cas de bipolarité et de dépression majeure. Ces résultats sont pour le moment associatifs. Néanmoins, les auteurs ont proposé que les formes de la reeline, retrouvées dans le sang, puissent servir de biomarqueurs potentiels dans le diagnostic de ces désordres neurologiques (Fatemi, Kroll et Stary, 2001).

L'autisme est un trouble neurodéveloppemental sévère de l'enfance dont l'origine est à la fois de nature génétique mais aussi reliée à des facteurs environnementaux. Parmi les nombreux gènes susceptibles d'être en lien avec la maladie se trouve celui, de plus en plus documenté, de la reeline (Muhle, Trentacoste et Rapin, 2004 ; Persico *et al.*, 2001 ; Polsek *et al.*, 2011). Des analyses post-mortem faites à partir de cerveaux adultes ont révélé une forte diminution (79 % à 51 %) de la reeline 400K et de ses isoformes 300K et 180K dans le cortex et dans une moindre mesure dans le cervelet de personnes atteintes d'autisme. Ces résultats

sont corrélés également à une diminution de l'expression du transcrit de la reeline (Fatemi *et al.*, 2005).

Dans le cerveau adulte, la reeline joue un rôle important dans la modulation de l'activité des récepteurs NMDA, lesquels sont impliqués dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémorisation. Des anomalies au niveau de l'expression de la reeline à l'âge adulte peuvent avoir des conséquences dans la signalisation médiée par ces récepteurs et ont été associées avec différentes maladies du vieillissement du cerveau (Knuesel, 2010).

Ainsi, des études suggèrent un lien entre des défauts d'expression de la reeline et la maladie d'Alzheimer. Il a été montré qu'une réduction de l'expression de la reeline favorise une hyperphosphorylation de la protéine Tau et accélère la formation de plaques  $\beta$ -amyloïdes, lesquelles sont reconnues comme un bio-marqueur majeur de la maladie d'Alzheimer et sont impliquées dans le mécanisme de neurodégénérescence associée à cette maladie (Kocherhans *et al.*, 2010). Une expression réduite de la reeline est associée à une augmentation significative du nombre et de la taille de ces plaques. Ces dernières s'accumulent particulièrement dans l'hippocampe, une région du cerveau impliquée dans l'apprentissage et la mémoire. D'autre part, une altération du niveau de glycosylation de la reeline et une augmentation de la quantité de fragment de 180K de la protéine ont été observées dans le liquide cérébro-spinal et dans le cortex frontal de patients souffrant d'Alzheimer (Botella-Lopez *et al.*, 2006). Une augmentation de la quantité de reeline 180K dans le liquide cérébro-spinal a également été observée chez les gens souffrant de la maladie de Parkinson, une autre maladie neurodégénérative caractérisée par une destruction progressive des neurones dopaminergiques (Botella-Lopez *et al.*, 2006).

Bien que le niveau d'ARNm de la reeline est plus élevé dans le cortex frontal des patients atteints d'Alzheimer, ceci ne semble pas se traduire par une augmentation des niveaux d'expression de la reeline 400K et du fragment de 300K, lesquels demeurent similaires à ceux mesurés chez des individus sains. Ces résultats suggèrent une altération dans le processus de clivage protéolytique de la reeline. Parallèlement à ceci, des études histologiques de cerveaux, à partir d'un modèle de souris transgénique présentant des



caractéristiques biochimiques et comportementales associées à la maladie d'Alzheimer, rapportent une co-localisation de la reeline avec des dépôts de plaques  $\beta$ -amyloïdes. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'avec le vieillissement, la reeline tend à s'agréger de manière anormale pour former des dépôts fibrillaires, ce qui créerait des conditions propices à la formation de plaques  $\beta$ -amyloïdes et l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Doehner *et al.*, 2010).

Il est à noter que la maladie d'Alzheimer est étroitement associée à des dérèglements dans l'expression de cytokines inflammatoires, lesquelles affectent notamment la survie des interneurons exprimant la reeline et contribuent du coup à la perte d'expression de cette protéine. Une production accrue de cytokines pro-inflammatoires facilite la formation d'agrégats de protéines (*e.g.* reeline et le peptide  $\beta$ -amyloïde) ainsi que la dérégulation des mécanismes protéolytiques. Avec l'âge, une inflammation chronique s'installe dans le cerveau, ce qui conduit à l'émergence de maladies neurodégénératives (Knuesel, 2010).

Enfin, des études chez l'animal ont montré que dans des conditions favorisant le déclenchement de l'épilepsie, il y a diminution de l'expression de la reeline et altération de la dispersion des cellules granulaire dans le gyrus dentelé (Tinnes *et al.*, 2011). Ce symptôme est relié à un défaut de migration des neurones.

### **3.2 Autres protéases dans la migration neuronale**

Diverses protéases à sérine ont été rapportées dans la littérature comme ayant un impact sur la migration neuronale. L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) en est un exemple. Il est principalement synthétisé dans le cervelet en développement. Une fois sécrété, il convertit la pro-enzyme plasminogène en sa forme active de plasmine. Le tPA est reconnu pour agir sur la croissance des neurites ainsi que sur la migration neuronale subséquente (Tsirka, 2002). Chez les souris dont le gène du tPA a été supprimé (*tPA*<sup>-/-</sup>), la vitesse de migration neuronale est retardée à près de 50 %, comparativement à des souris de type sauvage (Seeds, Basham et Haffke, 1999). Cela suggère que le tPA facilite la migration neuronale (Seeds, Basham et Haffke, 1999). Plus récemment, il a été montré que l'addition



de tPA exogène à des cultures de neurones corticaux induit leur agrégation (Ho-Tin-Noe *et al.*, 2009).

D'autres classes de protéases sont susceptibles d'agir dans la migration neuronale. C'est le cas de certaines métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP), particulièrement celles appartenant à la famille des endopeptidases dépendantes du  $Zn^{2+}$ , présentes tant dans la matrice extracellulaire, sous forme soluble, qu'à la surface des cellules. Les MMP régulent par clivage l'activité ou la demi-vie de protéines de la matrice extracellulaire, de cytokines et de molécules d'adhésion cellulaire (*e.g.* cadhérines, intégrines), ainsi qu'une variété de récepteurs membranaires. Le système des MMPs et de leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP) est impliqué dans divers processus tels que la neuroinflammation, la rupture de la barrière hémato-encéphalique, mais aussi au niveau de la croissance axonale et de la plasticité neuronale (Khrestchatisky *et al.*, 2003). Le système s'avère même être un outil prometteur dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques pour contrer les effets de maladies neurodégénératives (Khrestchatisky *et al.*, 2003 ; Rivera *et al.*, 2004).

### 3.3 Le système AMPc/PKA

Les communications intra- et inter-cellulaires de même que l'adaptation des cellules aux changements environnementaux sont capitales pour le bon fonctionnement de tous les organismes vivants. Les innombrables voies de signalisation intracellulaires assurent la réceptions des signaux extracellulaires, leur transmission et leur amplification dans la cellule, afin de générer une réponse cellulaire appropriée. Les voies de signalisation n'agissent pas indépendamment les unes des autres; elles s'entrecroisent plus souvent qu'autrement, ce qui permet une fine régulation de la réponse cellulaire. Ce phénomène porte le nom de communication signalétique. La voie signalétique de l'adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPc) fait partie des voies intracellulaires importantes et parmi les mieux connues, et communique avec plusieurs autres voies signalétiques effectrices.

L'une des voies les plus étudiées de l'AMPc est la voie AMPc/protéine-kinase A (PKA). L'AMPc active la PKA, laquelle est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de protéines nucléaires telles que des facteurs de transcription, des récepteurs hormonaux

nucléaires et des protéines associées à la chromatine (Shabb, 2001). Cette régulation s'opère via un facteur de transcription intermédiaire, la protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPc (CREB) (Benito et Barco, 2010). Dans certaines circonstances, PKA pourrait aussi phosphoryler des protéines extracellulaires telles la vitronectine (Shabb, 2001). La voie AMPc/PKA module des réponses à court terme et à long terme en agissant sur une grande variété d'enzymes, de canaux ioniques, de protéines structurelles et régulatrices et des facteurs de transcription (Shabb, 2001).

Généralement, l'activation de la voie signalétique de l'AMPc débute par l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G, tels que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, D1 dopaminergique ou encore le récepteur métabotrope glutamique de type 2 (mGluR2) (Shabb, 2001). La protéine G est une protéine tétramérique associée à la partie cytoplasmique du récepteur et est composée des sous-unités  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ . Lorsque le récepteur est inactif, la protéine G lie le GDP. Suivant la liaison d'un ligand au récepteur, les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  se dissocient de la sous-unité  $G\alpha$ , rendant cette dernière apte à lier le GTP. Le complexe  $G\alpha$ -GTP peut dès lors activer l'adénylate cyclase qui à son tour se chargera de produire de l'AMPc à partir des réserves d'ATP (Gerits *et al.*, 2008). L'AMPc agit comme second messager qui peut alors activer des kinases, des phosphatases, des petites protéines G et leurs modulateurs, afin d'assurer le relai du signal (Shabb, 2001).

Parmi les kinases activées par l'AMPc se trouve la PKA, une kinase dont le site catalytique est caractérisé par la présence d'une Ser et d'une Thr. La PKA est un tétramère composé de 2 sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytique (C). Différentes isoformes existent pour ces deux types de sous-unités : RI et RII et  $C\alpha$ ,  $C\beta$  et  $C\gamma$ , ce qui amène une diversification de la famille des PKA connues à ce jour (Kostenko *et al.*, 2011). Chacune des sous-unités R comporte deux sites de liaison pour l'AMPc. Suivant la liaison de l'AMPc aux sous-unités R, le tétramère se dissocie, libérant ainsi les sous-unités C qui deviennent actives pour phosphoryler d'autres substrats tant cytosoliques que nucléaires (Gerits *et al.*, 2008). L'AMPc peut aussi lier la phosphodiesterase (PDE), une enzyme qui a pour fonction de réguler les niveaux d'AMPc intracellulaire en catalysant l'hydrolyse de l'AMPc en AMP (Houslay, Sullivan et Bolger, 1998). Ce mécanisme assure la rétro-

inhibition de la voie signalétique de l'AMPc/PKA. Outre la PKA, d'autres effecteurs tels que les canaux dépendants de nucléotides cycliques et la protéine d'échange directement activée par l'AMPc (EPAC) sont également connues pour être des cibles activées par l'AMPc (Botia *et al.*, 2007).

Parmi les activateurs de la voie AMPc/PKA se trouve le polypeptide activateur de l'adénylyl cyclase hypophysaire (PACAP). Dans le SNC, le PACAP est exprimé fortement par l'hypothalamus mais également à des niveaux plus faibles dans d'autres régions du cerveau (Harmar *et al.*, 2012). On le retrouve également dans les tissus périphériques tels le tractus gastro-intestinal, le pancréas, les glandes surrénales et les gonades. L'action du PACAP est médiée par la liaison à l'un des trois récepteurs du PACAP couplés à une protéine G, PAC1, VPAC1 et VPAC2. Ceux-ci sont distribués dans tout l'organisme (Vaudry *et al.*, 2009). Du point de vue ontogénique, l'ARNm du PACAP est détecté tôt dans le développement du cerveau chez les rongeurs (E9,5) et son expression augmente progressivement durant la période embryonnaire pour atteindre un niveau maximal autour de la période périnatale (Vaudry *et al.*, 2009). Le PACAP a plusieurs actions biologiques. Il agit à titre d'hormone, neuro-hormone et comme neurotransmetteur et est notamment impliqué dans la régulation de d'autres neurotransmetteurs (*e.g.* catécholamine, somatostatine, glutamate), l'apprentissage et la mémorisation (génération de PLT), la régulation du rythme circadien, les systèmes cardiovasculaire et respiratoire, la réponse au stress et les dommages au cerveau, pour ne nommer que ceux-ci (Vaudry *et al.*, 2009).

Il est connu que le PACAP exerce des actions neurotrophiques dans le SNC en développement, spécialement dans le cervelet (Vaudry *et al.*, 2009). Suivant la liaison du PACAP à l'un de ses récepteurs, il induit l'activation de l'adénylate cyclase qui subséquemment induit une augmentation de l'AMPc. Il a été montré que le traitement de neurones du cervelet avec le PACAP provoque l'inhibition de la prolifération cellulaire au profit de la différenciation cellulaire, et diminue la migration des neurones (Cameron *et al.*, 2009). Ces effets du PACAP passent par la voie AMPc/PKA et implique notamment les kinases ERK (Botia *et al.*, 2007). Ces dernières seront abordées plus amplement dans la section suivante (sections 3.4).

### 3.4 Les protéine-kinases activées par des mitogènes (MAPK)

Les protéine-kinases activées par des mitogènes (MAPK) sont connues pour être impliquées dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose, la différenciation, la maturation fonctionnelle, l'adhérence, la motilité et l'expression génique (Cargnello et Roux, 2011 ; Gerits *et al.*, 2008 ; Widmann *et al.*, 1999). La voie signalétique impliquant les MAPK est activée en réponse à divers stimuli, comme la présence de facteurs de croissance ou de cytokines, des irradiations, le stress cellulaire et les changements d'osmolarité. Les substrats des MAPK sont majoritairement des facteurs de transcription mais peuvent être aussi d'autres protéines kinases, des phospholipases et des protéines associées au cytosquelette (Cargnello et Roux, 2011 ; Widmann *et al.*, 1999). Tel que souligné précédemment, la communication entre diverses voies signalétiques revêt une importance capitale dans la transduction du signal. Une importante relation existe entre la voie de l'AMPc/PKA et celle impliquant les MAPK (Gerits *et al.*, 2008 ; Kostenko *et al.*, 2011).

De manière générale, les MAPK sont activées par phosphorylation et ce processus dépend de deux étapes de phosphorylation situées en amont. Ainsi, un stimulus entraîne d'abord la phosphorylation/activation d'une MAPK-kinase-kinase (MAP3K), laquelle active une MAPK-kinase (MAP2K). Cette dernière reconnaît puis phosphoryle une MAPK au niveau d'un motif Thr-X-Tyr situé dans la boucle d'activation de cette kinase. X représente un acide aminé qui diffère d'une MAPK à l'autre (Widmann *et al.*, 1999). La phosphorylation des résidus Thr et Tyr induit un changement de conformation de la boucle d'activation qui rend la MAPK active. Cette dernière kinase activera d'autres kinases et/ou cibles effectrices par phosphorylation de résidus de Ser ou de Thr (Gerits *et al.*, 2008). Les MAPK forment six familles : ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, p38 et JNK (Li, Liu et Zhang, 2011 ; Widmann *et al.*, 1999). Parmi les kinases impliquées dans la voie des MAPK se distinguent certaines d'entre elles pour leur interaction avec la voie de l'AMPc/PKA : 1) RAF, une MAP3K qui active MEK (une MAP2K), laquelle peut activer les MAPK ERK, 2) JNK et 3) p38. Notons que les voies impliquant les kinases JNK, p38 et ERK 1/2 peuvent communiquer entre elles, ce qui peut entraîner des réponses globales plus complexes. Nous traiterons cependant plus



particulièrement de la voie menant à l'activation de ERK1/2 dans la section suivante (section 3.4.1).

La famille des MAPK JNK comporte trois isoformes (1-3), dont la JNK3 qui est exprimée seulement par les neurones. Cette voie de signalisation est impliquée majoritairement en réponse à un stress cellulaire mais aussi dans certaines situations qui concernent la survie et la croissance des cellules. JNK peut être activée par la voie classique des MAPK (i.e. MAP3K→MAP2K) ou encore par la famille des protéines Rho, comprenant Rac et cdc42. Les substrats directs de JNK sont des facteurs de transcription nucléaires, lesquels agiront à leur tour sur l'expression de gènes cibles (Cargnello et Roux, 2011 ; Widmann *et al.*, 1999).

La famille des MAPK p38 comporte quatre isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ [ERK6] et  $\delta$ ). Tout comme la voie JNK, p38 est activée lors de réponses à un stress cellulaire mais aussi par des cytokines inflammatoires. Elle est activée par la voie classique des MAPK mais également de manière indirecte par l'intermédiaire des petites protéines G de la famille Rho (Rac, et cdc42). Une fois phosphorylée, p38 peut activer différents effecteurs tels que d'autres protéines kinases qui conduiront à une augmentation de l'expression des protéines de choc thermique, des facteurs de transcription et des cytokines. Les implications biologiques de p38 sont dans l'apoptose et la survie cellulaires, de même que dans la prolifération des cellules (Cargnello et Roux, 2011 ; Widmann *et al.*, 1999). De plus, un lien semble exister entre p38 et certains processus reliés à la maladie d'Alzheimer, comme l'excitotoxicité et des modifications dans la plasticité synaptique, et la phosphorylation de la protéine Tau (Li, Liu et Zhang, 2011).

### 3.4.1 La famille des MAPK ERK

Il existe à ce jour sept isoformes de ERK, réparties dans les sous-groupes suivants : ERK1/2, ERK3/4, ERK5 et ERK7/8 (Krens, Spaink et Snaar-Jagalska, 2006). ERK1/2 sont les MAPK les plus étudiés à ce jour et seront abordées plus loin. Quant aux autres isoformes de ERK, peu de choses sont connues. ERK3, localisée au niveau du noyau de la cellule, est activée par PKC. Il a été montré que ERK4 est activée en réponse à des facteurs de croissance

comme le NGF ou le EGF et ce, de manière dépendante de la voie de signalisation impliquant Ras (Widmann *et al.*, 1999). ERK3/4 peuvent phosphoryler et activer MK5, une kinase qui se trouve quasi-exclusivement dans le noyau. Il est à noter que PKA peut également activer MK5 au niveau du noyau. MK5 activée agit au niveau de la transcription génique via l'activation de p53 mais peut aussi être exportée de manière transitoire dans le cytosol pour ultimement promouvoir la polymérisation des monomères d'actine pour former de l'actine filamenteuses (f-actin) (Kostenko *et al.*, 2011). La kinase ERK5, activée par des conditions de stress oxydatif et d'hyperosmolarité, active des facteurs de transcription (Widmann *et al.*, 1999). Des études génétiques révèlent que cette kinase est impliquée dans la formation des vaisseaux sanguins et dans le développement cardiovasculaire. À ce jour, aucune étude n'a rapporté de fonction précise pour ERK7 et son homologue ERK8 (Krens, Spaink et Snaar-Jagalska, 2006).

Les MAPK ERK1 et ERK2 dont les poids moléculaires sont respectivement de 44 kDa et 42 kDa sont les plus étudiées dans le domaine du développement. L'activation de ERK1/2 se fait par phosphorylation des résidus Thr-183 et Tyr-185 (Widmann *et al.*, 1999). ERK1/2 activée agit sur la prolifération et la différenciation cellulaires, sur le cycle cellulaire et la survie des cellules. Elle active notamment différents facteurs de transcription et des kinases dont le site catalytique comporte des résidus de Ser et de Thr. Parmi les substrats de ERK1/2, on compte p90 (un activateur de c-Fos), la GSK3 $\beta$  (qui régule c-Jun), l'AP-1, la phospholipase A<sub>2</sub> et l'EGF. Les facteurs de transcriptions activés par ERK incluent Elk1, Ets1, Sap1a, c-Myc, Tal et STAT (Cargnello et Roux, 2011). Il est intéressant de noter que ERK1/2 peut aussi phosphoryler des kinases en amont des MAPK, soient les MAP3K Raf1 et MAP2K MEK1, ce qui croit-on pourrait constituer un mécanisme de rétro-inhibition afin de réguler à la baisse l'activité de ERK1/2 (Widmann *et al.*, 1999).

Il a été montré qu'au niveau du cerveau, ERK1 est un modulateur de la plasticité synaptique et qu'elle régule les changements adaptatifs à long terme sur la plasticité du striatum. ERK1 semble également jouer un rôle dans le développement de la toxicomanie (Krens, Spaink et Snaar-Jagalska, 2006). L'isoforme ERK2 est particulièrement impliquée au cours de l'embryogénèse. Par le biais d'études réalisées sur des embryons de souris « knock-



out » *ERK2*<sup>-/-</sup>, il a été montré que cette kinase est impliquée dans la formation de l'ectoderme extra-embryonnaire lors de la maturation du trophoblaste, de même que dans la différenciation du feuillet mésodermique (Yao *et al.*, 2003). Une étude réalisée chez le poulet révèle une forte expression de phospho-ERK1/2 dans les axones moteurs (par opposition aux axones sensoriels), suggérant que ERK1/2 a un rôle dans la guidance et la croissance de ce type d'axones (Kato *et al.*, 2005). Très récemment, une étude réalisée à partir de cultures de neurones corticaux et de neurones granulaires du cervelet a montré qu'une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 stimule la migration de ces neurones (Yang *et al.*, 2012).

ERK peut aussi réguler l'activité de PKA via son action sur la protéine kinase RSK1 (*ribosomal-S6-kinase*). Sous la forme non-active (non-phosphorylée), RSK1 est liée aux sous-unités R de PKA, ce qui favorise l'état actif de PKA (les sous-unités C étant libres et aptes à activer d'autres kinases). Cependant, l'AMPc de même que certains facteurs de croissance peuvent promouvoir la phosphorylation de ERK1/2 qui dès lors peut directement phosphoryler RSK1. Phospho-RSK1 s'associe exclusivement aux sous-unités C de la PKA, ce qui stimule la réassociation des sous-unités R et C de PKA (Kostenko *et al.*, 2011).

## CHAPITRE IV : LE MODÈLE DE CARCINOME EMBRYONNAIRE MURIN P19

### 4.1 Origine du modèle et différenciation neuronale

La compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent le développement embryonnaire demeure un défi contemporain des plus importants. Autant la différenciation cellulaire que le développement des structures complexes d'un organisme dépendent de l'intercommunication et de la coordination de diverses voies de signalisation cellulaires (Ulrich et Majumder, 2006).

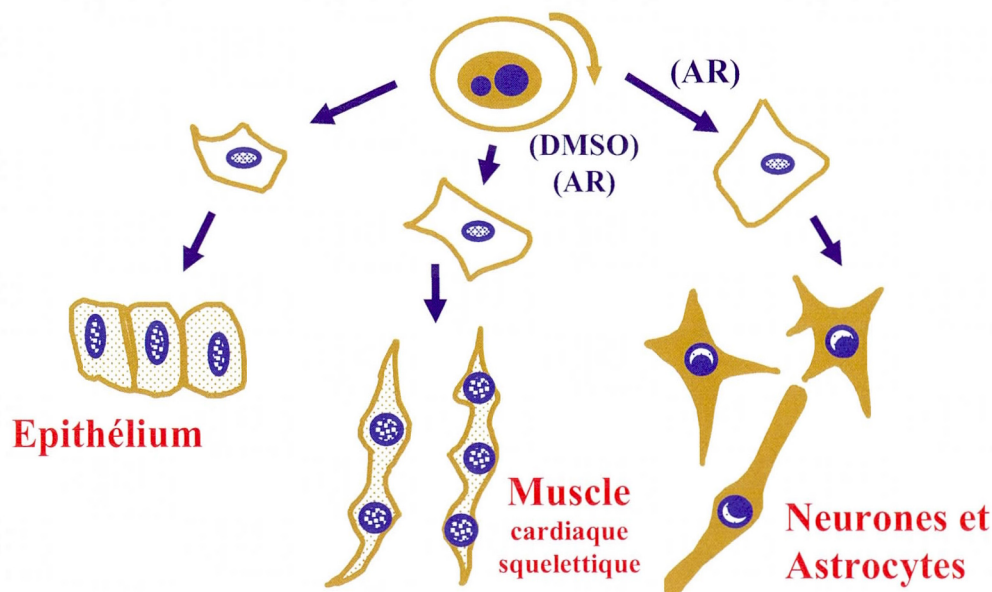
Le modèle cellulaire P19, développé initialement par le Dr McBurney, constitue jusqu'à ce jour un modèle solidement établi de cellules souches embryonnaires. Les cellules P19 sont des cellules de carcinome embryonnaire isolées d'un tératocarcinome formé par la transplantation, sur un testicule de souris, d'un embryon de souris et ce, au jour 7,5 de son développement, soit avant qu'il y ait initiation de la différenciation cellulaire et la séparation des couches germinales (McBurney, 1993). Les cellules P19 sont non-différenciées, prolifèrent rapidement et indéfiniment, et ont un caryotype euploïde mâle normal qui leur confère une stabilité génétique (McBurney, 1993). À l'image des cellules souches embryonnaires normales, elles ont la capacité ou le potentiel de donner naissance à tous les types cellulaires et sont donc dites pluripotentes (Rudnicki et Mc Burney, 1987). Les cellules P19 sont faciles à manipuler génétiquement de même que biochimiquement (MacPherson et Mc Burney, 1995 ; Ulrich et Majumder, 2006). Lorsqu'elles sont greffées à un embryon ordinaire qui se développe *in vivo* en milieu utérin, elles contribuent à la formation de tous les tissus de l'embryon, ce qui signifie que dans un environnement approprié, elles sont développementalement totipotentes (McBurney, 1993).

*In vitro*, on ne connaît pas les conditions générant les divers types cellulaires de l'organisme. Cependant, certains inducteurs de différenciation cellulaire ont été identifiés (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982 ; McBurney *et al.*, 1982). À titre d'exemple, les cellules P19

peuvent être différenciées en cellules de type épithélial, musculaire (cardiaque et squelettique) ou neuronal (fig. 4.1) (MacPherson et Mc Burney, 1995). En présence du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou d'une faible concentration d'AR ( $10^{-8}$  M), les cellules P19 ont la capacité de se différencier en cellules musculaires de type cardiaque comme squelettique (van der Heyden et Defize, 2003). Il a récemment été démontré que l'ocytocine, une hormone impliquée dans la contraction de l'utérus lors de l'accouchement ainsi que dans la contraction des canaux lactifères durant la lactation, peut induire les cellules P19 à se différencier en cardiomyocytes (Paquin *et al.*, 2002). D'autre part, lorsque les cellules P19 sont mises en présence de hautes concentrations d'AR ( $10^{-6}$  M) pendant quatre jours, elles se différencient en dérivés neuro-ectodermiques, tels que des neurones, des fibroblastes, des astrocytes, des cellules microgliales et des oligodendrocytes (Chiu *et al.*, 1995). Il est à noter que dans les premiers jours suivant l'exposition à l'AR, les cultures contiennent majoritairement des neurones et des fibroblastes. En absence de sérum, il y a très peu de fibroblastes et les neurones prédominent à près de 95 %. La neurodifférenciation peut être facilement obtenue et elle est reproductible. Les neurones P19 permettent de suivre l'acquisition de caractéristiques moléculaires, morphologiques et physiologiques spécifiques des neurones normaux du SNC (Ulrich et Majumder, 2006).

Aux jours 5-6 de la différenciation, les neurones nouvellement obtenus présentent plusieurs des caractéristiques retrouvées dans les populations neuronales normales du SNC. En plus d'être irréversiblement post-mitotiques, ils expriment bon nombre de marqueurs neuronaux tels que l'énolase spécifique aux neurones, la  $\beta_{III}$ -tubuline, les neurofilaments, la protéine associée aux microtubules-2 (MAP-2), Tau, aussi associée aux microtubules, de même que plusieurs autres antigènes spécifiques (Chiu *et al.*, 1995 ; MacPherson et Mc Burney, 1995).

Les neurones nouvellement différenciés acquièrent ensuite les traits de neurones matures de manière graduelle et programmée. Conséquemment, ces cellules constituent un excellent modèle pour étudier le développement neuronal, incluant la différenciation et la maturation. Quelques jours suivant la différenciation induite par l'AR, soit du J5 au J10, une forte proportion de neurones synthétisent une grande variété de neurotransmetteurs tels que le



**Figure 4.1 Le modèle cellulaire P19.** Les cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 ressemblent aux cellules souches embryonnaires : elles sont indifférenciées, prolifératives (flèche ocre) et pluripotentes. Elles peuvent se différencier en dérivés cellulaires des trois feuillets germinatifs *in vivo* et *in vitro*. (AR, acide rétinoïque; DMSO, diméthylsulfoxyde) Schéma adapté de Rudnicki et Mc Burney (1987).

GABA, le glutamate et l'acétylcholine, des neuropeptides comme la somatostatine et le neuropeptide Y et des enzymes nécessaires à la biosynthèse de neurotransmetteurs (*e.g.* glutamate-décarboxylase, tyrosine-hydroxylase, et choline-acétyltransférase) et celle de neuropeptides (*e.g.* protéine-convertase-2) (Jeannotte *et al.*, 1997 ; Ulrich et Majumder, 2006). Des protéines impliquées dans le fonctionnement des synapses sont également produites par les neurones incluant des protéines du cytosquelette, des vésicules synaptiques et des terminaisons axonales (Parnas et Linial, 1995), ainsi que des récepteurs de neurotransmetteurs dont ceux du GABA (Reynolds *et al.*, 1996 ; Reynolds *et al.*, 1994) et du glutamate (MacPherson *et al.*, 1997). Ultérieurement, les neurones développent la capacité de larguer des neurotransmetteurs et des neuropeptides sous stimulation (Cadet et Paquin, 2000 ; Parnas et Linial, 1995). Le profil en neurotransmetteurs et neuropeptides des neurones P19 indique la génération de populations neuronales mixtes qui ressemblent à celles de l'hippocampe, du striatum et du néocortex (Cadet et Paquin, 2000 ; MacPherson *et al.*, 1997).

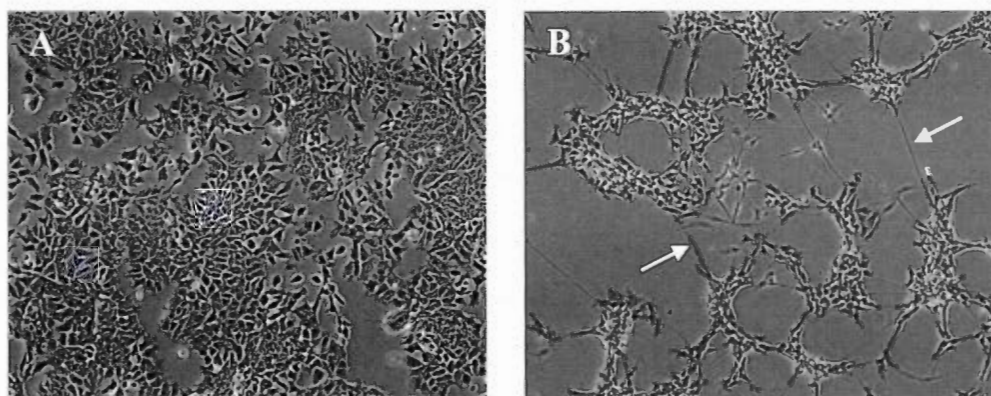


Les neurones P19 développent aussi une sensibilité électrophysiologique au niveau de leurs membranes, assurant une bonne acquisition des propriétés électriques des neurones matures (Cheun et Yeh, 1991 ; Magnuson *et al.*, 1995 ; Morassutti *et al.*, 1994). Des études de « patch-clamp » ont montré que les neurones P19 nouvellement différenciés déploient un courant dépendant du voltage entrant, attribuable aux ions  $\text{Na}^+$ , puis un courant rectificateur sortant attribuable aux ions  $\text{K}^+$ . Ceci n'est pas observé sur les cellules P19 non-différenciées (Cheun et Yeh, 1991). Les neurones montrent de grandes dépolarisations en réponse à des stimuli électriques 14 jours suivant le traitement à l'AR et sont aptes à générer des potentiels d'action matures avec des amplitudes d'environ 80 à 100 mV après 28 jours de culture (MacPherson et Mc Burney, 1995).

Du point de vue morphologique, les neurones P19 ont de petits corps cellulaires qui projettent plusieurs extensions correspondant à des neurites (fig 4.2). Il est possible d'observer une morphologie semblable dans les cultures neuronales primaires. Les prolongements neuritiques des cellules P19, dépendamment de leur stade de maturité, se multiplient, s'étendent, se complexifient et se différencient en axones et en dendrites (Finley, Kulkarni et Huettner, 1996 ; Magnuson *et al.*, 1995). Il s'en suit la formation de synapses qui sont morphologiquement matures et établissent un réseau synaptique fonctionnel avec les cellules environnantes (Finley, Kulkarni et Huettner, 1996 ; Magnuson *et al.*, 1995 ; McBurney *et al.*, 1988).

Finalement, la densité des neurones P19 en culture est un facteur susceptible d'influencer le phénotype de neurotransmission des neurones. Ainsi, une augmentation de la densité cellulaire accélère la maturation des neurones P19 et favorise le développement d'un phénotype glutamatergique (Parnas et Linial, 1997b). Les manifestations de cette augmentation sont perceptibles notamment par une augmentation de la sécrétion d'aspartate après une stimulation avec du KCl, par une élévation de l'expression protéique spécifique aux synapses, par une stimulation de la croissance des projections neuritiques ainsi que par une ségrégation précoce des dendrites et des axones (Parnas et Linial, 1997a). À l'opposé, une diminution de la densité cellulaire diminue le phénotype glutamatergique au profit d'un phénotype cholinergique.



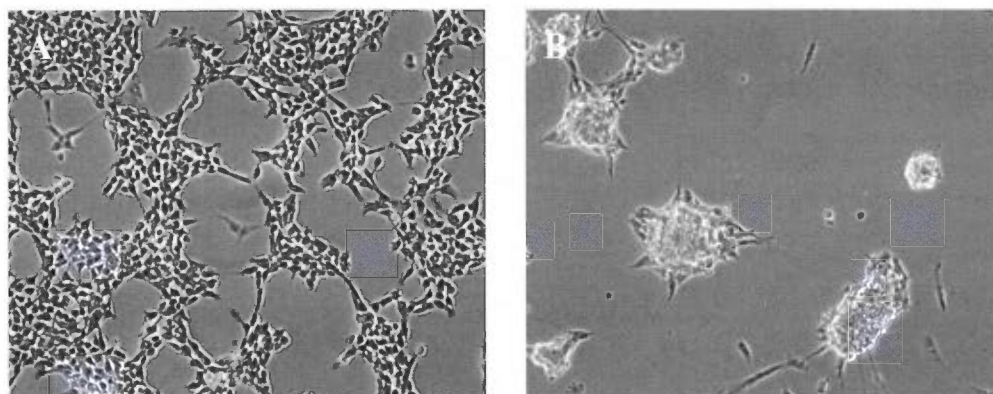


**Figure 4.2 Micrographies de cellules P19.** A Cellules non différenciées, B Neurones (les flèches pointent des neurites). Grossissement 100X.

#### 4.2 Action neuroagrégitrice de la CP

Récemment, les équipes des Drs Paquin et Mateescu ont montré que la CP peut induire l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules P19 *in vitro* (Maltais *et al.*, 2003). Cette action soulève la possibilité d'un rôle de la CP dans l'organisation architecturale du système nerveux en développement. L'effet neuroagrégitif induit par la CP a été partiellement caractérisé. Les neurones incubés en présence de CP forment, dans un délai de 24 à 48 h, des agrégats compacts qui adhèrent au support de culture, alors que les neurones non traités forment un réseau en monocouche (fig. 4.3).

Il a été rapporté que l'agrégation des neurones est dépendante de la concentration en CP et est saturable au-delà de 3,8  $\mu\text{M}$  CP. En utilisant de la CP marquée à la digoxigénine (CP-DIG), une petite molécule pour laquelle il existe un anticorps spécifique, des études de liaison ont montré que la CP se lie aux neurones mais non aux cellules indifférenciées. L'interaction entre la CP-DIG et les neurones peut être déplacée par ajout d'un excès de CP non marquée, ce qui suggère que l'interaction entre les neurones et la CP pourrait être de type ligand-récepteur (Maltais *et al.*, 2003). La neuroagrégitrice induite par la CP ne provoque pas la nécrose ou l'apoptose. L'effet neuroagrégitif de la CP est indépendant du type de matrice utilisé pour la culture des cellules. La substitution de la CP native par d'autres molécules incluant d'autres protéines à cuivre (*e.g.* la laccase, et l'amine-oxidase sérique), la CP



**Figure 4.3 Agrégation des neurones P19 induite par la CP.** A Neurones P19 en absence de CP. B Neurones P19 traités avec la CP pendant 24 h.

dénaturée par la chaleur, de l'albumine, des sels de cuivre ou encore le complexe  $\text{His}_2\text{-Cu}$ , n'a pas provoqué l'agrégation des neurones. Ces résultats militent en faveur d'un caractère spécifique de l'action neuroagrégate de la CP. Le présent projet s'imbrique donc dans la poursuite des travaux entamés au laboratoire, en vue de mieux comprendre ce phénomène de neuroaggrégation et en découvrir les mécanismes et la signification physiologique.

**PARTIE II**  
**PARTIE EXPÉRIMENTALE**

## CHAPITRE V : PROJET DE RECHERCHE

### 5.1 Problématique

Le fonctionnement du cerveau nécessite une organisation finement régulée du système nerveux. Une telle organisation s'établit durant le développement et dépend de mécanismes tels que la neurogénèse, la neuromigration et l'élaboration de contacts neurones-cellules et neurones-matrice extracellulaire (MEC). Pour ce faire, plusieurs molécules sont mises à contribution, dont des facteurs de croissance, des protéases, des molécules d'adhésion cellulaire et de guidage ainsi que les composantes de la MEC. Une défaillance de ces mécanismes peut entraîner le développement de désordres neurologiques tels que la schizophrénie, l'épilepsie et le retard mental (Gleeson, 2001 ; Grilli *et al.*, 2003). Parmi les molécules susceptibles de contribuer au développement du cerveau, nous nous sommes intéressés à la céruloplasmine (CP), une protéine retrouvée dans le cerveau et dont l'activité de ferroxidase lui confère un important rôle de régulateur du métabolisme du fer dans le cerveau. Nous pensons que la CP pourrait aussi avoir un rôle dans l'organisation architecturale du système nerveux en développement, possiblement en lien avec la neuromigration. En effet, les récents travaux publiés par les équipes des Drs Paquin et Mateescu ont montré que la CP peut induire l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires P19 (Maltais *et al.*, 2003). Les mécanismes cellulaires qui sous-tendent l'action de la CP sur les neurones sont à investiguer, de même que la signification biologique de cette action.

Du point de vue ontogénique, la CP apparaît tôt dans le développement de l'embryon de souris (i.e. dans le liquide du sac vitellin, le sérum et le liquide amniotique de l'embryon), puis progressivement dans le foie, à partir de E15 (Gorbunova et Baranov, 1984). D'autres études ont montré que la CP est exprimée dans différentes régions du cerveau de souris à des niveaux variables selon la région et l'âge aussi (Chang *et al.*, 2005). Cependant, on connaît peu sur l'expression de la CP dans le cerveau avant la naissance, une information nécessaire pour mieux cerner un possible rôle développemental de la CP dans cet organe. Qui plus est,



très peu est connu sur les voies de signalisation médiées par la CP et les rares études qui se sont penchées sur ce sujet datent.

La neuromigration nécessite l'intervention de différentes molécules, dont l'une des plus connues est la reeline (Kim *et al.*, 2002). La reeline est une glycoprotéine de la MEC sécrétée par des neurones. Elle existe sous forme native d'environ 400K (Lacor *et al.*, 2000) ainsi que sous forme de fragments de 300K et 180K à partir de la terminaison NH<sub>2</sub> native (fig. 3.1) (Jossin *et al.*, 2003). On ne connaît à peu près rien sur les protéases responsables de ces clivages de même que sur le rôle de ces fragments. De plus, on ne connaît à peu près rien du profil d'expression de ces fragments durant le développement.

Certaines voies de signalisation activées par la reeline sont bien documentées. Trois récepteurs membranaires auxquels la reeline peut se lier sont connus : les récepteurs lipoprotéiques ApoER2 et VLDLR ainsi que le récepteur  $\alpha_3\beta_1$ -intégrine. Lorsque la reeline se lie à l'un de ces trois récepteurs, elle induit le recrutement de la protéine adaptatrice cytosolique Dab-1 qui est dès lors oligomérisée puis phosphorylée. La phosphorylation de Dab-1 est essentielle pour assurer la fonction de la reeline dans l'organisation des couches de neurones dans le cortex en développement (Jossin *et al.*, 2004). Il est important de souligner que l'ARNm de la reeline et de Dab-1 sont tous deux exprimés dans le modèle P19 (Bogoch et Linial, 2008 ; Howell, Gertler et Cooper, 1997), lequel modèle permet ainsi de sonder les relations possibles entre la CP et la reeline. Un autre mécanisme d'action de la reeline pourrait être sa capacité à agir comme protéase à sérine, une catégorie de protéines qui ont un rôle dans le développement et la migration des neurones.

## 5.2 Hypothèse de travail

En considérant l'action agrégative de la CP sur des neurones naissants en culture ainsi que son expression dans le cerveau, nous avons émis l'hypothèse que la CP pourrait avoir un rôle dans le développement du cerveau. En particulier, nous pensons que ce rôle pourrait être en lien avec le phénomène de migration neuronale. Considérant le rôle que joue la reeline et d'autres protéases à sérine dans ce processus, ces molécules pourraient être impliquées ou avoir un lien avec l'action neuroagréative de la CP. D'autre part, étant donné que la CP peut



se lier aux neurones, il est possible qu'elle puisse agir sur la signalisation intracellulaire, possiblement sur la signalisation de l'AMPc.

### 5.3 Objectifs de recherche

L'hypothèse de cette présente thèse a été éprouvée et documentée selon les objectifs suivants :

1. Déterminer s'il existe des relations entre l'action neuroagrégate de la CP et la reeline, ou d'autres protéases à sérine extracellulaires, dans la lignée cellulaire P19. Cette lignée est un modèle flexible pour étudier le développement du système nerveux.
2. Si des relations existent entre la CP et la reeline *in vitro*, dans le modèle P19, déterminer leur pertinence physiologique *in vivo* durant le développement du système nerveux. Des similarités dans les actions de la CP *in vitro* et *in vivo* justifieront la pertinence d'étudier plus en profondeur le phénomène de neuroagrégation induit par la CP dans le modèle P19 (objectif 3).
3. Dans le modèle P19, définir les mécanismes cellulaires de l'action neuroagrégate de la CP en identifiant les voies de signalisation impliquées.

### 5.4 Approche expérimentale

Les objectifs 1 et 3 concernent le modèle P19 et requièrent une source de CP exogène. Aussi, les sections 5.4.1 et 5.4.2 présentent respectivement un résumé du protocole de purification de la CP, à partir de sang de bœuf, et un résumé du protocole de culture et différenciation neuronale des cellules P19. Les approches expérimentales plus spécifiques des objectifs poursuivis sont présentées dans les sections 5.4.3 à 5.4.5.

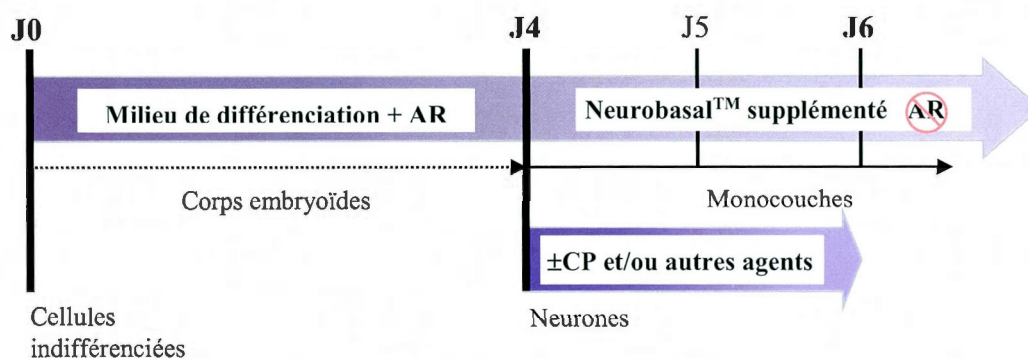
#### 5.4.1 Purification de la CP à partir de sang de bœuf

La purification de la CP à partir du sang de bœuf est effectuée selon la procédure développée par l'équipe du Dr Mateescu (Mateescu *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1994). Brièvement, au moment de la collecte du sang (Boucherie - abattoir Tarte Enr., Marieville, Québec, Canada), une solution d'anticoagulant de citrate de sodium est ajoutée afin de

prévenir la formation de caillots sanguins. Une première série de centrifugation permet de séparer les érythrocytes, pour ne conserver que la fraction plasmatique du sang. Cette dernière est soumise à une première précipitation avec du sulfate d'ammonium (35 % de saturation). Après incubation de 2 h sous agitation, le mélange est centrifugé puis la fraction soluble est menée à 55 % (saturation) de sulfate d'ammonium puis incubée pendant 30 min. Le mélange est à nouveau centrifugé et le surnageant résultant est éliminé. Le culot est resuspendu dans un tampon phosphate de potassium (KPi) 10 mM, pH 7,2, puis est soumis à une dialyse contre ce même tampon durant 20 h, avec deux changements de tampon durant cette période. Par la suite, le contenu des sacs à dialyse est à nouveau centrifugé, puis le surnageant final est récupéré pour être déposé sur une colonne chromatographique d' aminoéthyl(AE)-agarose préalablement équilibré avec du tampon KPi. Le surnageant final est passé dans la colonne au moyen d'une pompe péristaltique, en circuit fermé, avec un débit de 120 mL/h. Ensuite, la colonne est lavée avec du tampon KPi 20 mM, pH 7,2 (dix volumes). La CP retenue sur AE-agarose est visible par sa coloration bleue caractéristique. La protéine est éluée par l'ajout d'un tampon KPi 200 mM pH 7,2. Les fractions récoltées qui contiennent la CP (i.e. fractions teintées de bleu) et dont le rapport de densité optique 610/280 nm est égal ou supérieur à 0,04, un critère bien établi pour juger de la pureté ainsi que de l'intégrité conformationnelle de la CP (Lovstad, 1981), sont combinées ensembles. L'absorbance à 610 nm est attribuée au cuivre de la CP, alors que celle à 280 nm correspond au contenu en protéine. La solution finale de CP est diluée deux fois, afin de réduire la teneur en KPi, et finalement concentrée par ultracentrifugation dans des tubes à centrifugation équipés de filtres ayant une porosité de 5K. Enfin, la préparation de CP est dosée pour son contenu en protéines et sa pureté est confirmée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE).

#### **5.4.2 Culture, différenciation et traitement des cellules P19**

La différenciation neuronale des cellules P19 (fig. 5.1) est effectuée en cultivant les cellules en suspension durant quatre jours, en présence d'AR comme agent inducteur. Les cellules en suspension forment des sphères multi-cellulaires appelées « corps embryoïdes ». Au jour quatre (J4), les cellules des corps embryoïdes sont individualisées puis cultivées sur pétri tissulaire contenant du milieu Neurobasal® enrichi de supplément B27 mais dépourvu de



**Figure 5.1 Protocole de différenciation neuronale des cellules P19.** Des jours (J) 0 à J4, les cellules P19 non-différenciées sont cultivées en suspension en présence d'acide rétinoïque (AR)  $10^{-6}$  M. À J4, les cellules des corps embryoïdes sont individualisées puis cultivées sur pétri tissulaire contenant du milieu Neurobasal<sup>®</sup> supplémenté, sans sérum ni AR. Les neurites apparaissent dans les deux jours qui suivent. Les différents traitements (±CP et/ou autres agents) sont appliqués à partir du J4.

sérum et d'AR. Les neurites apparaissent dans les deux jours qui suivent. Les différents traitements (±CP et/ou autres agents) sont appliqués à partir de l'ensemencement du J4 (à moins que cela soit spécifié autrement). La neuroagrégation est appréciée morphologiquement. Différents champs de culture sont photographiés pour ensuite déterminer la surface occupée par les neurones en utilisant une grille transparente. L'augmentation de la surface libre de cellules indique une plus grande efficacité de l'agrégation. D'autre part, une diminution du décompte neuritique est un autre indicateur d'agrégation cellulaire. Nous avons suivi aussi la neuroagrégation en temps réel. Au moyen d'une chambre de culture installée à même le microscope, où les conditions de culture sont parfaitement contrôlées, et d'un système de prises de photos automatisé, des observations en continu (cinétique) ont été réalisées, pour des périodes de temps pouvant atteindre 48 h (i.e. de J4 à J6) (Annexe 1). Cette étude pilote a été utile pour déterminer le moment de la formation des neuroagrégats et a influencé la conception de certaines expériences ultérieures en vue de caractériser les rôles de la CP et de la reeline.

### 5.4.3 Stratégies pour étudier les relations possibles entre l'action neuroagrégate de la CP et la reeline ou d'autres protéases à sérine *in vitro*

Considérant le rôle que joue la reeline et d'autres protéases à sérine au cours du développement neuronal, nous évaluerons leur implication dans le phénomène neuroagréatif induit par la CP sur les neurones P19. Pour ce faire, deux inhibiteurs de protéases à sérine à larges spectres d'action, soit l'inhibiteur de trypsine de la fève de soya (SBTI) et l'aprotinine, ont été ajoutés au milieu de culture des neurones P19 au J4 du protocole de neurodifférenciation, en présence ou non de la CP. Il est à noter que l'aprotinine a été montrée comme étant capable d'inhiber l'action protéolytique de la reeline (Quattrocchi *et al.*, 2002). L'impact des deux inhibiteurs a été évalué dans un premier temps morphologiquement tels que décrit précédemment (section 5.4.2). Dans l'éventualité où une activité de protéase à sérine est impliquée dans l'action de la CP sur les neurones P19, nous investiguerons les cibles potentielles de cette action protéasique, à commencer par la CP.

*In vivo*, la reeline native (400K) peut être clivée à deux sites pour générer les fragments N-t de 300K et 180K. Les trois espèces peuvent être reconnues par l'anticorps anti-reeline G10 (fig. 3.1). À ce jour, aucune étude ne rapporte le profil protéique de la reeline dans le modèle P19. Ainsi, nous souhaitons d'abord vérifier la présence de la reeline dans le modèle P19 (i.e. cellules P19 non-différenciées) puis établir par la suite son profil temporel au cours de la différenciation neuronale de même que lors de la neuroagrégation induite par la CP. Tant les milieux neuroconditionnés que les extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardage en utilisant l'anticorps G10. Dans l'éventualité qu'une activité protéolytique soit impliquée dans la neuroagrégation induite par la CP, il sera pertinent de vérifier si cette activité cible la reeline.

L'anticorps CR-50 reconnaît spécifiquement un epitope de la reeline au niveau de la partie N-t. Cette région de la reeline est considérée importante du point de vue expérimental car lorsque l'anticorps CR-50 s'y lie, il bloque l'action de la reeline en empêchant l'interaction de la reeline avec ses récepteurs, possiblement de manière stérique, ce qui conduit à une inhibition de la voie de signalisation de la reeline (fig. 3.3). Dans cette perspective, il a été pertinent de vérifier si l'ajout du CR-50 dans le milieu de culture des

neurones contenant la CP interfère dans le phénomène neuroagréatif normalement induit par la CP.

Les mécanismes d'action de la reeline ainsi que l'identité de ses cibles ne sont pas complètement connus. Toutefois, deux importants récepteurs de la reeline ont été mis en évidence dans la littérature : ApoER2 et VLDLr. Lorsqu'activés, ces récepteurs peuvent recruter puis activer la protéine adaptatrice Dab-1. Aucune étude ne rapporte l'expression protéique des récepteurs de la reeline dans le modèle P19. Dans le contexte de la neuroaggrégation induite par la CP et l'implication possible de la reeline, il a été approprié de vérifier l'expression de même que le profil protéique des récepteurs de la reeline et de Dab-1 dans les neurones P19.

L'ensemble des résultats issus de ces différentes stratégies utilisées ont pour pertinence de mieux comprendre l'importance des protéases à sérine et de la reeline dans la neuroaggrégation induite par la CP. Les résultats, présentés dans le 1<sup>er</sup> manuscrit (chapitre VI) montrent que l'action neuroagréative de la CP implique une activité protéolytique extracellulaire et que le traitement des neurones avec la CP stimule la formation de la reeline 300K. Ce fragment s'accumule après l'installation de la neuroaggrégation et n'apparaît donc pas nécessaire à la neuroaggrégation. Les résultats nous amènent à suggérer deux modèles de relation entre la neuroaggrégation et la génération de la reeline 300K : un modèle dans lequel la génération de la reeline 300K est une conséquence de la neuroaggrégation et un modèle dans lequel les deux phénomènes sont indépendants l'un de l'autre.

#### **5.4.4 Stratégies pour étudier les relations possibles entre la CP et la reeline *in vivo***

À ce jour, aucune information n'existe en ce qui a trait au profil ontogénique de la CP dans le cerveau. Ainsi, nous avons souhaité établir le profil de la CP dans les cerveaux de souris C57BL/6 de type sauvage pour déterminer si elle est exprimée à des moments du développement qui s'accordent avec les effets de la CP *in vitro*. Ce travail a été fait par immunobuvardage. D'autre part, très peu d'études se sont penchées sur l'analyse de l'expression de la reeline et de ses fragments dans l'ontogénèse du cerveau. En conséquence, nous avons aussi déterminé le profil développemental de la reeline dans l'ontogénèse de



cerveaux de souris de type sauvage mais également dans les cerveaux de souris C57BL/6 dépourvues de CP ( $CP^{-/-}$ ). Cela est d'autant plus important que la CP stimule la génération de la reeline 300K dans les neurones P19. Le profil ontogénique de la reeline a été réalisé par immunobuvardage pour évaluer l'expression relative de la reeline native (400K) et de ses fragments N-t 300K et 180K durant le développement. Nous avions prévu que même si nous ne réussissions pas à montrer une relation possible entre la CP et la reeline, les résultats de l'analyse du profil ontogénique des isoformes de la reeline seraient des résultats originaux puisqu'à peu près rien n'est connu à ce sujet. Enfin, comme la cofiline est une cible de la reeline, nous avons étudié le profil ontogénique de la phosphorylation de la cofiline pour déterminer si un effet possible de la CP sur la reeline pouvait avoir une répercussion sur le profil de la cofiline. Deux couples de souris  $CP^{-/-}$ , ainsi qu'une femelle supplémentaire  $CP^{-/-}$ , données par Dr Samuel David (Centre de recherche en neuroscience, Université McGill, Montréal, Canada) et trois couples de souris de type sauvage achetés de la compagnie Charles River ont servi de fondateurs pour chacune des colonies. Les colonies ont été maintenues afin d'avoir le nombre d'échantillons de cerveau nécessaires pour toutes les analyses. Les cerveaux de souris ont été prélevés à différents stades couvrant la période embryonnaire du développement du cerveau (jours E10.5, E12.5, E14.5 et E17.5), de même qu'à des périodes plus tardives du développement et de la maturation du cerveau, jusqu'à l'âge adulte. (i.e. jours post-nataux P1, P4, P7, P10, ainsi qu'à 2, 3, 4, 5, 6, et 7 sem.). Le tableau 5.1 résume, pour la souris, la correspondance des principaux événements qui caractérisent le développement du cerveau avec l'âge de l'animal.

Au niveau expérimental, j'ai développé une méthode afin de déterminer avec une meilleure exactitude le jour de gestation d'une femelle qui a été préalablement mise en accouplement. Cette méthode repose sur la prise quotidienne du poids des femelles, suivant l'observation d'un bouchon vaginal indiquant qu'il y a eu activité sexuelle. Ces données m'ont permis de dresser une courbe de croissance du poids des femelles gestantes, tant pour les souris de type sauvage que les souris  $CP^{-/-}$  (Annexe B). Ces profils ont permis de suivre d'autres femelles en gestation afin de confirmer leur stade de grossesse et le jour de fécondation (E0.5). Cette méthode s'est avérée très utile dans les cas où le moment de conception (i.e. E0.5) n'a pu être déterminé/vérifié avec certitude, à cause par exemple de

**Tableau 5.1 Correspondance des grandes étapes du développement du cerveau avec l'âge des souris**

Jour	Étape du développement du cerveau
E6-7	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gastrulation, formation des trois feuillets germinatifs dont l'ectoderme, précurseur du système nerveux</li> </ul>
E8-9	<ul style="list-style-type: none"> <li>Apparition de la plaque neurale, neurulation (tube neural), spéciation neuronale et prolifération cellulaire</li> </ul>
E10-18	<ul style="list-style-type: none"> <li>Corticogénèse; migration radiale et tangentielle</li> <li>Première vague apoptotique (précurseurs neuronaux et neuroblastes)</li> <li>Début de l'expression des principaux neurotransmetteurs du SNC</li> </ul>
(E12)	(Formation de la préplaque)
E19-P21 et +	<ul style="list-style-type: none"> <li>Synaptogénèse, axogénèse, myélinisation</li> <li>Deuxième vague apoptotique (neurones post-mitotiques matures et cellules gliales)</li> </ul>
6 <sup>e</sup> -7 <sup>e</sup> semaine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cerveau adulte</li> <li>Plasticité synaptique (PLT et DLT)</li> </ul>

l'absence d'un bouchon vaginal. Également, il arrive souvent qu'un examen visuel ne permette pas de conclure de manière sûre si une femelle est gestante en deçà de E12.

Ainsi, cet outil complémentaire a été pratique pour valider la gestation d'une femelle avant même l'apparition des premiers changements physiques annonciateurs de cet état (*e.g.* gonflement de l'abdomen, développement mammaire, distention abdominale), puisque la variation du poids devient significative dès E7.5 (sauvage) et E8.5 ( $CP^{-/-}$ ). Enfin, il arrive dans d'autres cas que la femelle ait été accouplée sans que cela ne mène à une gestation, ou encore que des problèmes durant la gestation provoquent un avortement spontané. À ce propos, il est à souligner que le succès d'accouplement/mise bas des souris de souche C57BL/6 est de l'ordre de 50 %. En définitive, le suivi quotidien du profil de croissance du poids des femelles possiblement en gestation a permis de réduire le nombre des femelles à euthanasier pour fins de prélèvement des embryons. En effet, les femelles qui ne prenaient

pas de poids étaient remises en accouplement plutôt que d'être sacrifiées pour rien. De plus, ce suivi a permis de confirmer avec exactitude l'âge des embryons lors du prélèvement, permettant d'obtenir le nombre d'échantillons nécessaires pour réaliser l'étude en sacrifiant moins d'animaux. Ce raffinement des procédures a été fort apprécié par le Comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) et cette façon de faire a été adoptée par d'autres équipes de recherche.

Les résultats, présentés dans le 2<sup>e</sup> manuscrit (chapitre VII), montrent que la CP apparaît dans le cerveau en développement avant ou en même temps que la reeline. Les trois formes N-t de la reeline (400K, 300K et 180K) apparaissent rapidement durant la période embryonnaire chez les souris de type sauvage. Cependant, la forme de 300K est bien moins abondante chez les souris  $CP^{-/-}$ , un résultat tout à fait en accord avec les observations faites dans le modèle P19. Les souris  $CP^{-/-}$  ont aussi des niveaux affaiblis de phospho-cofiline.

#### **5.4.5 Stratégies pour étudier les mécanismes cellulaires de l'action agrégative de la CP sur les neurones P19**

À ce jour, nous ne connaissons pas la ou les voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'action neuroagréative de la CP. Considérant que l'action de la CP sur les neurones P19 puisse refléter un rôle de cette protéine dans le développement des neurones, nous avons ciblé à partir de la littérature, certaines voies de signalisation intracellulaires connues pour leur implication durant le développement neuronal.

Nous avons procédé par criblage avec des agents pharmacologiques ciblant des voies rapportées comme ayant une action possible dans la migration ou l'adhésion des neurones. Ainsi nous avons utilisé un inhibiteur et un activateur des voies suivantes : PKA (H89 et AMPc), PKC (chélérythrine et phorbol 12-myristate 13-acétate), et l'augmentation du calcium intracellulaire (inhibée par le chélateur BAPTA-AM). Ce criblage a été réalisé par une stagiaire de 1<sup>er</sup> cycle, Nathalie St-Pierre, sous ma supervision. Les résultats préliminaires ont révélés un impact de la voie PKA et nous avons donc étudié plus en profondeur les effets du H89 et de l'AMPc sur la neuroagrégation et le profil protéique de la reeline. La MAPK ERK1/2 est aussi importante dans la migration cellulaire et peut communiquer de façon

croisée avec la voie de l'AMPc/PKA. Nous avons donc déterminé le profil temporel de la phosphorylation d'ERK1/2 en réponse au traitement avec la CP et évalué l'effet d'une inhibition de la signalisation d'ERK1/2 sur la neuroagrégation et le profil protéique de la reeline.

Les résultats, présentés dans le 3<sup>e</sup> manuscrit (chapitre VIII), montrent que les deux actions trophiques de la CP sur les neurones naissants P19, soient l'induction de la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K, peuvent se produire indépendamment l'une de l'autre. La neuroagrégation est sensible aux niveaux d'AMPc et d'activité PKA alors que la génération de la reeline 300K dépend d'une activation (phosphorylation) précoce d'ERK1/2.

## **5.5 Contributions à la recherche**

La découverte d'une synthèse de la CP dans le cerveau est relativement récente ( $\approx 15$  ans). Depuis, son rôle de régulateur du métabolisme du fer dans ce tissu a été bien documenté et est accepté. Nos études antérieures avaient soulevé la possibilité d'un rôle de la CP dans le développement neuronal. Les résultats du présent projet appuient un tel rôle de cette protéine dans le développement neuronal.

Les résultats de la thèse sont rapportés dans les trois prochains chapitres et sont présentés sous la forme de manuscrits. Le Chapitre 6 (1<sup>er</sup> manuscrit) porte sur l'objectif 1. Le Chapitre 7 (2<sup>e</sup> manuscrit) porte sur l'objectif 2. Finalement, le Chapitre 8 (3<sup>e</sup> manuscrit) porte sur l'objectif 3.

## **CHAPITRE VI : L'AGRÉGATION DES NEURONES P19 INDUITE PAR LA CÉRULOPLASMINÉ IMPLIQUE UNE ACTIVITÉ DE PROTÉASE À SÉRINE ET EST ACCOMPAGNÉE PAR UN CLIVAGE DE LA REELINE**

Le travail de ce chapitre a été publié, en 2010, dans la revue *Neuroscience* 167 (3) : 633-43.

Ce chapitre montre qu'en plus d'induire l'agrégation des neurones P19, la CP stimule la génération de la reeline 300K. Une ou des protéases à sérine extracellulaires sont impliquées dans ces actions de la CP. Deux modèles de relation entre la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K sont suggérés : un modèle dans lequel la génération de la reeline 300K est une conséquence de la neuroagrégation et un modèle dans lequel les deux phénomènes sont indépendants l'un de l'autre.

La planification et la réalisation des expériences, le traitement des données expérimentales, la recherche bibliographique, le montage des figures ainsi que la rédaction du manuscrit ont été réalisés par P. Ducharme sous la supervision du Dre J. Paquin. D. Maltais, ex-étudiant de maîtrise et premier observateur de l'effet agrégatif de la CP sur les neurones P19 (Maltais *et al.*, 2003, *Neuroscience*), avait fait quelques études préliminaires sur l'effet des inhibiteurs de protéases SBTI et aprotinine en 2000-2001. D. Desroches, ex-étudiante de maîtrise, avait proposé l'idée de s'intéresser à la reeline en 2002-2003 à la suite d'une consultation approfondie de la littérature. Ces deux étudiants ont également révisé et approuvé le manuscrit tel qu'il a été publié. Le Dr M.-A. Mateescu a fourni son expertise concernant la CP et a également participé à la révision du manuscrit.



Les résultats ont été présentés sous forme de communication dans les congrès suivants :

P. Ducharme, D. Maltais, D. Desroches, M.-A. Mateescu et J. Paquin : L'action neuroagréative de la céruloplasmine implique une activité de protéase à sérine et conduit au clivage de la reeline. 5e Colloque annuel du Centre de Recherche BioMed. Montréal, 30 avril 2009

P. Ducharme, D. Maltais, D. Desroches, M.-A. Mateescu et J. Paquin : L'action neuroagréative de la céruloplasmine implique une activité de protéase à sérine et conduit au clivage de la reeline. 77e Congrès de l'Association Francophone pour le savoir (ACFAS). Ottawa, 11 au 15 mai 2009

P. Ducharme, D. Maltais, D. Desroches, M.-A. Mateescu et J. Paquin : L'action neuroagréative de la céruloplasmine impliquerait une activité protéolytique. 48e réunion annuel du Club de Recherches cliniques du Québec(CRCQ). St-Alexis-des-Monts, 21 au 23 septembre 2006

P. Ducharme, D. Maltais, D. Desroches, M.-A. Mateescu et J. Paquin : L'action neuroagréative de la céruloplasmine impliquerait une activité protéolytique. 2e Colloque annuel du Centre de Recherche BioMed. Montréal, 27 avril 2006

## 6.1 Résumé

L'organisation cyto-architecturale du système nerveux dépend en partie de protéases extracellulaires, incluant la reeline. Cette protéine de 400 kDa (K), qui existe également sous des formes de 300K et 180K dérivées de la partie N-terminale de la protéine, peut lier le récepteur de l'apolipoprotéine E de type 2 (ApoER2) ainsi que le récepteur de lipoprotéine de très faible densité (VLDLr). La céruloplasmine (CP) est une protéine multifonctionnelle retrouvée dans la circulation sanguine et aussi exprimée à la surface des cellules gliales dans le cerveau. Il a été observé que la CP induit l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires P19. Ce résultat indique un rôle développemental potentiel de la CP dans l'organisation neuronale, possiblement en relation avec la reeline et d'autres protéases à sérine extracellulaires. Aussi, nous avons évalué l'effet d'inhibiteurs extracellulaires de protéases à sérine sur la neuroagrégation induite par la CP puis analysé le profil d'expression de la reeline. Les résultats montrent que l'inhibiteur de trypsine de la fève de soya et l'aprotinine (SBTI + Apro), deux inhibiteurs à large spectre d'inhibition, empêchent l'action neuroagréative de la CP. Les cellules P19 non différenciées de même que leurs dérivées neuronales sécrètent la reeline 400K. Le fragment 180K est présent pendant et après la différenciation, alors que le fragment 300K est très peu détectable. Toutefois, la présence de la CP dans les cultures neuronales stimule la génération du fragment 300K et l'ajout de SBTI + Apro inhibe cet effet. L'étude de profils temporels et l'utilisation d'un anticorps bloqueur de la fonction de la reeline indiquent que la neuroagrégation ne dépend pas de la génération du fragment 300K ou de l'action de la reeline. L'action neuroagréative de la CP implique donc une protéase à sérine extracellulaire et différente de la reeline. D'autre part, la stimulation du clivage de la reeline par la CP appuie la possibilité d'un rôle de la CP dans le développement du système nerveux. Comme les cellules P19 expriment aussi ApoER2 et VLDLR, elles peuvent aider à comprendre les relations existant entre la CP, la reeline, et d'autre(s) protéase(s) intervenante(s).

*Manuscript*

**CERULOPLASMIN-INDUCED AGGREGATION OF P19 NEURONS  
INVOLVES A SERINE PROTEASE ACTIVITY AND IS ACCOMPANIED BY  
REELIN CLEAVAGE**

**Philippe Ducharme, Domyrick Maltais, Dominique Desroches,  
Mircea Alexandru Mateescu, and Joanne Paquin\***

*Département de chimie et de biochimie and Centre BioMed, Université du Québec à  
Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec) H3C 3P8, Canada*

\*Address correspondence and reprint requests to : Dr. Joanne Paquin, Département de chimie et de biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec) H3C 3P8, Canada, Phone : (514) 987-3000, ext. 4990, Fax : (514) 987-4054, E-mail : [paquin.joanne@uqam.ca](mailto:paquin.joanne@uqam.ca)

**Footnotes**

**Abbreviations used:** ApoER2, apolipoprotein E receptor 2; Apro, aprotinin; BAEE, N-benzoyl-L-arginine ethyl ester; CP, ceruloplasmin; Dab1, Disabled-1; EGF, epidermal growth factor;  $\alpha$ MEM, alpha-modified Eagle's minimal essential medium; PBS, phosphate buffer saline; RA, retinoic acid; SBTI, soybean trypsin inhibitor; SDS, sodium dodecylsulfate; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor.

## 6.2 Abstract

The cytoarchitectural organization of the nervous system depends partly on extracellular serine proteases, including reelin. This 400K protein, which also exists as the N-terminally-derived 300K and 180K fragments, acts through binding to the lipoprotein receptors ApoER2 and VLDLR. Ceruloplasmin (CP), a multifunctional protein found in the circulation and also expressed on glial cells, was shown to bind to, and induce aggregation of neurons newly differentiated from P19 embryonic stem cells. This indicated a potential developmental role of CP in neuronal organization, possibly in relation with reelin and other extracellular serine proteases. Therefore, we analysed the effect of cell-impermeant, large spectrum, serine protease inhibitors on CP-induced neuroaggregation and studied reelin expression. Soybean trypsin inhibitor and aprotinin (SBTI+Apro) inhibited CP neuroaggregative action. Undifferentiated and neurally-differentiating cultures secreted the 400K reelin. The 180K fragment was present during and after differentiation whereas the 300K species was barely detectable. However, CP stimulated generation of the 300K in the differentiated neuronal cultures, and SBTI+Apro abolished this CP effect. Time course profiles and function-blocking antibody indicated that neuroaggregation does not depend on the generation of the 300K fragment or on reelin action. CP neuroaggregative action thus involves a pericellular serine protease, different from reelin. On the other hand, the CP stimulation of reelin cleavage is in line with a possible role of CP in nervous system development. Since P19 cells express ApoER2 and VLDLR, they can help understanding relationships existing between CP, reelin and intervening protease(s).

**Key words :** Copper proteins, embryonic stem cells, neuronal differentiation, neuronal migration, soybean trypsin inhibitor and aprotinin, immunoblotting

### 6.3 Introduction

Ceruloplasmin (CP), a 132 kDa blue copper oxidase secreted by the liver, is abundantly found in the plasma. CP is also synthesized in the brain as a glycosylphosphatidylinositol-protein anchored to the surface of glial cells (Klomp et Gitlin, 1996 ; Patel et David, 1997). CP has multiple functions. It is the main copper carrier in plasma, an important regulator of iron metabolism through its ferroxidase activity (Harris *et al.*, 1995 ; Klomp et Gitlin, 1996 ; Patel *et al.*, 2002 ; Qian et Ke, 2001), an oxidase acting on aromatic amines and nitric oxide (Inoue *et al.*, 1999 ; Shiva *et al.*, 2006 ; Zaitsev *et al.*, 1999), and an antioxidant exhibiting cardioprotective and neuroprotective actions (Aouffen *et al.*, 2001 ; Atanasiu *et al.*, 1996 ; Atanasiu *et al.*, 1998 ; Goldstein *et al.*, 1982). In the brain, CP is well established as a regulator of iron metabolism, and hereditary aceruloplasminemia causes iron accumulation and neurodegeneration (Harris *et al.*, 1995 ; Patel *et al.*, 2002 ; Qian et Ke, 2001). However, the presence of CP in this organ could indicate other functions. For instance, our previous work showed that CP binds to, and induces aggregation of neurons newly differentiated from mouse P19 embryonic stem cells *in vitro* (Maltais *et al.*, 2003), suggesting a possible role in neuronal architectonic organization during nervous system development.

Neuronal organization, the result of neuron migration and positioning, depends in part on extracellular serine proteases such as plasminogen activators/plasmin systems, thrombin and kallikreins (Yoshida et Shiosaka, 1999). Reelin, a protein secreted by specialized Cajal-Retzius cells and GABAergic neurons and endowed with serine protease activity (D'Arcangelo *et al.*, 1995 ; Quattrocchi *et al.*, 2002 ; Scotti et Herrmann, 2002), has a key role in the proper cerebral cortical lamination (Forster *et al.*, 2006). *Reeler* mice, having defective reelin, have disorganized neuronal architectonic patterns (Jossin *et al.*, 2004). Undue persistence of reelin is also associated with cortical malformations (Eriksson *et al.*, 2001). Various reports implicated reelin in human diseases such as lissencephaly, schizophrenia and autism (Fatemi, 2005b ; Fatemi *et al.*, 2005 ; Guidotti *et al.*, 2000 ; Hong *et al.*, 2000). The reelin structure comprises a F-spondin-like sequence in the N-terminal moiety, eight central repeats containing each an epidermal growth factor (EGF) motif, and a highly charged C-terminus. *In vivo*, reelin is cleaved at two sites, respectively located between repeats 2 and 3 (site N-t) and between repeats 6 and 7 (site C-t) (Jossin, Gui et



Goffinet, 2007 ; Lambert de Rouvroit *et al.*, 1999). Fragments of 180K (from cleavage at site N-t) and 300K (from cleavage at site C-t) bear the native N-terminus. Proteolysis at site N-t involves a still poorly characterized metalloprotease (Jossin, Gui et Goffinet, 2007 ; Kohno *et al.*, 2009a). Nothing is known regarding the protease responsible for the C-t cleavage.

Reelin has pleiotropic effects on neuronal organization, possibly through concentration gradients (Costa *et al.*, 2001 ; Dulabon *et al.*, 2000). It can first act as a chemoattractant stimulating the migration of neurons onto glial cell fibers, and then as a stop signal immobilizing neurons onto fibers or causing their detachment from this support (Dulabon *et al.*, 2000). Mechanisms of these effects are not completely understood. However, reelin binds to two lipoprotein receptors, the very low-density lipoprotein receptor (VLDLR) and the apolipoprotein E receptor type 2 (ApoER2) (D'Arcangelo *et al.*, 1999 ; Hiesberger *et al.*, 1999 ; Trommsdorff *et al.*, 1999), activating the intracellular protein adaptor Disabled-1 (Dab1) pathway (Howell, Herrick et Cooper, 1999 ; Kerjan et Gleeson, 2007 ; Tissir et Goffinet, 2003). Further downstream signaling partners are not well established (Khono *et al.*, 2009a). The exact implication of reelin proteolytic activity is unknown.

The P19 murine embryonic carcinoma cell line provides an useful model to study early aspects of nervous system development. P19 cells indeed resemble the pluripotent stem cells of the embryo and efficiently differentiate into neurons and glial cells when induced with retinoic acid (RA). The neuronal derivatives mature to functional neurons resembling those of the central nervous system (Cadet et Paquin, 2000 ; Jeannotte *et al.*, 1997 ; MacPherson *et al.*, 1997 ; Parnas et Linial, 1997a). We hypothesized that aggregation of P19 neurons induced by CP could indicate a role of the protein in neuron migration or positioning. Considering the importance of reelin as well as of other extracellular serine proteases in these phenomena, we studied the effect of cell-impermeant serine protease inhibitors on CP-induced neuroaggregation, and analysed reelin protein expression in cultures treated or not with CP. Expression of ApoER2, VLDLR and Dab1 was also assessed.

## 6.4 Experimental procedures

### 6.4.1 CP preparation

CP was purified from bovine plasma by fractionated precipitation with ammonium sulfate followed by chromatography on aminoethyl-agarose (Mateescu *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1994). CP preparations were pure as confirmed by the  $A_{610nm}/A_{280nm}$  values greater than 0.04 and by the homogeneous protein profiles of silver stained electrophoresis gels. In one set of experiments, CP was treated with soybean trypsin inhibitor (SBTI) conjugated to agarose beads (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in order to remove any proteolytic activity inhibitable by SBTI in the preparation before addition to the culture medium. CP (300  $\mu$ L of 25 mg/mL) was incubated three times with 50  $\mu$ L of beads in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, for 1 h at room temperature. Aliquots of the resulting supernatant were used in cell treatments. When this SBTI-agarose procedure was applied to trypsin, the beads were found to retain 490 units of proteolytic activity defined with N-benzoyl-L-arginine ethyl ester as the substrate (BAEE units).

### 6.4.2 Cell culture, differentiation and treatment

P19 cells were cultured and differentiated as described (Maltais *et al.*, 2003). Undifferentiated cells were grown in propagation medium consisting of alpha-modified Eagle's minimal essential medium ( $\alpha$ MEM; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA Laboratories, Rexdale, ON, Canada), 50 U/mL penicillin and 50  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). To induce neuronal differentiation, P19 cells were seeded, on day zero, in bacteriological-grade culture dishes, and grown as floating spheroids, during 4 days, in differentiation medium ( $\alpha$ MEM containing 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 5% bovine serum [PAA Laboratories] and 0.5  $\mu$ M RA [Sigma-Aldrich]). This medium was replenished on day 2. On day 4, spheroids were dissociated in the presence of trypsin. Trypsin action was stopped by adding propagation medium, and dissociated cells were carefully washed with phosphate buffer saline (PBS), transferred to gelatinized tissue culture dishes and cultured in serum-free maturation medium (Neurobasal medium containing 2% v/v B27 supplement [Invitrogen] and 0.5 mM L-glutamine). The resulting adherent cultures were about 95% enriched in

neurons until at least day 10 (Poirier *et al.*, 2006). The concentrations of treating agents added in culture media were: 0.5 mg/mL CP, 100 µg/mL SBTI (Sigma-Aldrich), 30 µg/mL aprotinin (Apro; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) and up to 8 µg/mL CR50 anti-reelin monoclonal antibody (MBL International, Woburn, MA, USA). After the treatments, culture media were collected and complemented with protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich), and cells subjected to total protein extraction. Culture media and cell extracts were stored at -20°C until analysis.

#### **6.4.3 Neuronal aggregation evaluation**

The size of the culture surface occupied by cells and deployment of the neuritic network were used to evaluate aggregation. Photographs of cultures were taken at 100X magnification using a Nikon inverted TMS-F microscope (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada), developed to 16.5 cm x 22 cm pictures and placed under a transparent grid made of 638 squares of 56 mm<sup>2</sup> each. Squares occupied by cells were counted (aggregation decreased the number of occupied squares). Apparent neurites were also counted. Well spread cells extended numerous visible neurites whereas only few neurites grew out of aggregates. They rather remained within aggregates where they were not easily distinguishable. Morphological analysis was done blindly with respect to cell treatments, and value for each dish was the average of three pictures.

#### **6.4.4 Total protein extraction**

P19 cultures were washed with PBS, lysed in Tris buffer saline (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6) containing 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS] and protease inhibitor cocktail I), and lysates clarified at 10 000 g for 10 min. Protein extracts were also prepared from brains of Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, QC, Canada). Rats were euthanized by exposure to CO<sub>2</sub> according to the rules of the Canadian Council for Animal Care. Brains were collected on ice, washed in cold PBS, and homogenized with a potter, at 4°C, in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 1% v/v Triton X-100 and protease inhibitor cocktail I. Homogenates were clarified by centrifugation at 100 000 g for 1 h, and diluted tenfold in detergent-free homogenization

buffer. Protein concentration in extracts was determined with the Micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA).

#### **6.4.5 Western blotting**

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was done in the presence of 2-mercaptoethanol (Cadet et Paquin, 2000). Molecular weight markers (broad range, Bio-Rad) and protein samples (cell extracts, 20 µg; brain extracts, 10 µg; culture media, 30 µL) were loaded onto 10% polyacrylamide gels (6% for reelin), and run for 75 min at 115 V (15 min at 75 V followed by 75 min at 150 V for reelin) using MiniProtean TetraCell assembly (Bio-Rad). Proteins were then electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes for 35 min (2 h for reelin), using a Trans-blot SD system (Bio-Rad). Membranes were blocked with 3% non-fat dry milk in Tris buffer saline containing 0.1% Tween-20, before immunoblotting. Primary antibodies were used in the following dilutions: mouse G10 anti-reelin (Calbiochem, San Diego, CA, USA), 1/1000; rabbit anti-human CP (Dako, Mississauga, ON, Canada), 1/2000; mouse anti-β-actin (Sigma-Aldrich), 1/80000; rabbit α20 anti-ApoER2 (a gift from Dr. J. Nimpf, University of Vienna, Austria), 1/5000; and mouse 6A6 anti-VLDLR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 1/100. Secondary antibodies, conjugated to horseradish peroxidase, were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Immune complexes were revealed with Immobilon Western Chemiluminescent Substrate (Millipore, Nepean, ON, Canada) and exposition to HyBlot CL film (Denville Scientific Inc., Toronto, ON, Canada). Densitometric analysis was done using Chemilmager 5500 scanner and software (Alpha Innotech, CA, USA).

#### **6.4.6 Chromogenic casein assay of protease**

Protease activity was assayed by incubating 50 µL resorufin-labeled casein (Roche Diagnostics), 100 µL sample (culture medium or CP preparation), and 50 µL buffer at 37°C, as per manufacturer's instructions. In another assay, resorufin-casein was added to cultures (50 µL for each 150 µL culture medium). Absorbance was taken at 574 nm. Trypsin solution was used as the positive control.



#### 6.4.7 Statistics

Statistical analysis was done using Student's *t* test and the JMP IN 4.0.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and  $p < 0.05$  was used as the significance value.

### 6.5 Results

#### 6.5.1 Effect of SBTI and Apro on CP-induced neuronal aggregation

As already reported (Maltais *et al.*, 2003), incubation of newly differentiated P19 neurons with 0.5 mg/mL CP over 24 to 48 h (from day 4 to days 5-6 of the differentiation protocol) induced their aggregation (Fig. 6.1A, Control *versus* CP). In absence of CP, neurons spread on the culture support and extended many visible neurites. In contrast, after incubation with CP, neurons associated into compact aggregates that still adhered to the support, and neurites rarely grew out of the aggregates. Figs 6.1B and C show the quantitative changes in culture surface occupancy and neuritic deployment. These changes were not due to CP toxicity since there were no apoptosis nor necrosis in CP-treated cultures as already reported (Maltais *et al.*, 2003). Implication of extracellular serine proteases in CP-induced neuroaggregation was evaluated with SBTI and Apro. Action of these polypeptidic inhibitors is exclusively extracellular because they do not diffuse across cell membranes due to their high molecular weight (respectively 21.5K and 6.5K). Interest in using these inhibitors also resides in their similarly large spectrum of serine protease targets, encompassing chymotrypsinogen, chymotrypsin, trypsinogen, trypsin, kallikreins, plasminogen activators and plasmin. Apro can abolish reelin proteolytic activity (Quattrocchi *et al.*, 2002), and SBTI, although not yet tested with reelin, was shown to inhibit migration of various cell types, including cancer cells, endothelial cells and neutrophils (Furie, Naprstek et Silverstein, 1987 ; Kobayashi *et al.*, 2004 ; Shakiba, Mansouri et Mostafaie, 2007). In these later studies, SBTI was used at 100  $\mu\text{g/mL}$  (4.6  $\mu\text{M}$ ) or similar concentrations. We thus set to use SBTI at this concentration, and Apro at identical molarity (4.6  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$ ). At this concentration, SBTI and Apro were not toxic to cells since they did not hamper cell spreading and neuritic deployment (Fig. 6.1A, SBTI/Apro *versus* Control). When these inhibitors were added with CP to the culture medium, they abolished CP-induced neuroaggregation (Fig. 6.1, CP *versus* CP+SBTI/Apro). In this case, surface occupancy and neuritic deployment had values similar to those of control



cultures. SBTI and Apro, used in combination throughout, also inhibited aggregation separately. Serum or CP preparations were not a source of proteases for neurons. Aggregation experiments were indeed done in the absence of serum. CP preparations had no detectable proteolytic activity when assayed with resorufin-labeled casein, a general protease substrate (Twining, 1984), and this for up to 20 h and with three times the CP concentration used in neuroaggregation. CP preparations had also no gelatinase activity by zymography. Finally, pretreatment of the CP preparation with SBTI-agarose prior to incubation with neurons did not prevent their aggregation, further confirming the cellular origin of the proteolytic activity. SBTI and Apro acted as specific protease inhibitors and not through a general protein effect since 250  $\mu\text{g/mL}$  bovine serum albumin did not inhibit CP-induced aggregation. Altogether the results indicate that a pericellular serine protease activity of cellular origin is involved in CP's neuroaggregative action.

Resorufin-casein was also added in neuronal cultures to assess any change in proteolytic activity levels. After 24 h, cultures not treated and treated with CP exhibited identical absorbances, respectively  $0.037 \pm 0.006$  and  $0.037 \pm 0.007$  (means  $\pm$  SEM for three independent determinations). Such absorbance values corresponded to 0.004 BAEE unit of trypsin. The values dropped to baseline when SBTI/Apro were provided to the cultures. CP-induced neuroaggregation thus does not seem to involve major upregulation of proteolytic activity.

### 6.5.2 CP and reelin protein profiles in neuronal aggregation

Whether CP itself could be a target of neuroaggregation-associated protease was assessed by Western blotting. CP exposed to neurons in absence or presence of SBTI and Apro exhibited the same protein profile as the pure, non-exposed CP (Fig. 6.2). There was no report of reelin expression in the P19 model. We investigated this aspect with the G10 antibody raised against a N-terminal epitope of reelin. The antibody recognizes the 400K protein and its 300K and 180K fragments (Jossin *et al.*, 2003). As expected, the three species were present in rat brain extracts (Figs 6.3A, B, E). The 400K reelin was detected in the culture medium of undifferentiated P19 cell monolayers (Fig. 6.3A, lane 1). This was due to

secretion since there was no immunoreactivity in culture media in absence of cells. Addition of RA to these undifferentiated cultures did not change the reelin profile (Fig. 6.3A, lane 2). Reelin was also produced by cell spheroids during the 4 days of neuroinduction with RA (Fig. 6.3A, lanes 4 and 6). In this case, the 400K was accompanied by the 180K fragment. Appearance of the 180K fragment could be due to the tight association of cells in the spheroids since it was also observed in spheroid cultures not treated with RA (not shown). The 300K reelin was barely detectable, even when we avoided changing the culture medium at day 2 of neurodifferentiation (not shown). The 400K and 180K reelin still predominated in culture media of day 6 neurons (Fig. 6.3B, lane 1). Interestingly, the treatment of neurons with CP stimulated the production of the 300K species by 3-fold (Figs 6.3B, lane 2, and 3C). This effect did not occur in undifferentiated and spheroid cultures (Fig. 6.3A, lanes 3, 5 and 7). Moreover, the 300K stimulation was abolished when SBTI and Apro were present with CP (Figs 6.3B, lane 4, and 6.3C). The protease inhibitors had no effect on 180K reelin level in neuronal cultures (Fig. 6.3B, lanes 3 and 4, and Fig. 6.3C), in accordance with the involvement of a metalloprotease in the production of this fragment (Jossin, Gui et Goffinet, 2007 ; Kohno *et al.*, 2009a). We also tested whether maintenance of tight cellular associations after RA induction could suffice to stimulate the generation of 300K reelin, independently of CP. At day 4 of neurodifferentiation, spheroids were transferred into tissue culture dishes without prior trypsinization in order to maintain cell-cell associations. Spheroids adhered to the culture surface and were incubated during 48 h to permit the accumulation of reelin and this, in the absence of CP. Trypsinized spheroids incubated with CP (the usual procedure) were used as the positive control for 300K reelin. Fig. 6.3D shows that the compact arrangement of cells by itself did not induce generation of 300K reelin (compare lanes 1, 3 and 4), even when the number of neuronal spheroids was doubled at time of plating (lane 2). Altogether, these results indicated that the stimulation of 300K reelin was observed only after the neurodetermination period and in the presence of CP, suggesting a timely specific role of CP in development. In addition, the generation of 300K reelin, inhibited by the presence of SBTI and Apro during neuroaggregation, occurred extracellularly as indicated in Fig. 6.3E. Immunoblots showed that in all cultures (treated or not with CP, SBTI and Apro), reelin was expressed in cells mainly as a protein larger than 400K, fitting with a reported 450K reelin species (Jossin *et al.*, 2004). The origin of this

larger reelin species is not understood; difference in co/post-translational modifications has been suggested but not documented (Tissir et Goffinet, 2003). If some 180K reelin fragments seemed to be present in P19 neurons, there was no 300K species. The presence of the 180K fragment inside cells is in accordance with the study of Hibi and Hattori (Hibi et Hattori, 2009) reporting the intracellular generation of this fragment from endocytosed reelin.

### **6.5.3 CP neuroaggregative action does not depend on the generation of 300K reelin and reelin function**

Time course analysis was performed to determine the temporal relationship existing between neuroaggregation and 300K reelin production in response to CP treatment. The results are shown in Fig. 6.4, together with the protein expression profiles of ApoER2, VLDLR and Dab1, the signaling partners of reelin in neuronal organization. The 400K reelin began to accumulate at detectable levels in the medium of neuronal cultures between 4 and 12 h post-seeding, followed by the 180K fragment, and this independently of the presence of CP. However, the 300K reelin was more abundant in the presence of CP and began to accumulate in large quantities around 24 h post-seeding. Neuroaggregation in the presence of CP was already clearly observed by 12 h post-seeding (% of surface occupancy), thus preceding the accumulation of 300K reelin. The reelin receptors ApoER2 and VLDLR were found to be expressed in undifferentiated P19 cells (not shown) as well as in their neuronal derivatives (Fig. 6.4). Immunoblotting for ApoER2 detected two bands of apparent molecular weights of 150K and 109K respectively, similar to reported values (Koch *et al.*, 2002). Anti-VLDLR antibody detected a single band of about 160K, also in agreement with published size (Mikhailenko *et al.*, 1999 ; Poirier *et al.*, 2008). Both receptors are expressed in P19-derived neurons at time of seeding and their expression increased until 48 h post-seeding with larger increments starting after 4 h. Dab1 was expressed at low levels before 12 h post-seeding and then increased until 48 h. The expression patterns of all three proteins were similar in control and CP-treated neurons; some seemingly slight differences between the two populations were not statistically supported. Upregulation of reelin signaling partners thus almost paralleled that of 400K reelin and did not depend on CP treatment. We then used the reelin function-blocking antibody CR50 to evaluate whether reelin, even in trace amounts at the beginning of the culture, could be involved in CP-induced neuroaggregation. This

antibody, which recognizes a N-terminal epitope in reelin, was indeed shown (i) to inhibit the proteolytic activity of the protein which resides in its N-terminal moiety (Quattrocchi *et al.*, 2002), (ii) to block the homopolymerisation of reelin necessary to activate the Dab1 pathway (Utsunomiya-Tate *et al.*, 2000), and (iii) to result in perturbed histogenic organization of embryonic cortical neurons at the end of five culture days (Ogawa *et al.*, 1995). When provided to the culture medium of P19 neurons at reported inhibitory concentration, CR50 did not prevent CP-induced neuroaggregation and reelin cleavage to the 300K species (Fig. 6.5). When the resulting culture media were analysed by reducing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting, it was found that CR50 recovery was not affected by the presence of CP during cell treatment, or by any trace of proteolytic activity that could have been stimulated by CP. In another series of experiments, the culture medium of P19 neurons was collected at day 6, and provided to freshly seeded day 4 neurons. The day 6-conditioned medium, which contained detectable amounts of 400K and 180K reelin (Fig. 6.3B, lane 1), did not induce neuroaggregation. Thus reelin, at the level produced by P19 neurons, had no pro-neuroaggregative effect. Altogether, the results indicate that reelin cleavage to the 300K species and reelin function are not triggering factors of neuroaggregation in CP treatment.

## 6.6 Discussion

This study shows that the neuroaggregative action of CP on newly differentiated P19 neurons involves a pericellular serine protease, yet to be identified. Reelin, a regulator of neuronal migration endowed with putative serine protease activity, could have been a candidate. The use of function-blocking antibody and the provision of culture medium containing reelin indicate that this is not the case. However, there is a link between CP and reelin since CP-induced neuroaggregation was accompanied by the production of the 300K reelin species in the medium. This species did not form in the presence of the serine protease inhibitors SBTI and Apro that abolished the neuroaggregative action of CP. However, the 300K species is likely not required for neuroaggregation, as indicated by the time course data. The presence of CP and not simply tight cell-cell association was necessary to stimulate the cleavage of reelin to 300K in neuronal cultures. Indeed, when day 4 neuroinduced spheroids were plated without prior dissociation with trypsin, there was no upregulation of the 300K reelin, perhaps reflecting a maturational influence of CP on nascent neurons.

Formation of the 300K reelin could thus be a consequence of CP-induced neuroaggregation, or a parallel slower event also triggered by CP treatment (Fig. 6.6). This work also revealed, for the first time, the expression of ApoER2 and VLDLR in the P19 mouse embryonic stem cell model. This finding together with the presence of reelin indicates that the P19 cell line possesses components of the reelin pathway, as was suggested by Howell *et al.* (Howell, Gertler et Cooper, 1997) after they detected Dab1 in these cells.

The results of the present work are in line with, but yet do not confirm, our hypothesis that CP could have a role in neuronal migration/positioning. A unique study has pointed to such physiological relevance of CP in nervous system development. Indeed, the 1A1 antibody, raised against an unknown antigen on astrocytes, was shown to inhibit the adhesion and migration of neurons onto radial glial cells in postnatal cerebellar microexplant cultures (Mittal et David, 1994b). That elegant study has perhaps not received all the attention it deserves because identification of the antigen as CP occurred only few years later (Patel et David, 1997) and researches in the field of CP at that time and further on were mostly focused on the regulatory role of the protein in iron metabolism (Vassiliev, Harris et Zatta, 2005). Because neurons derived from P19 cells resemble those of the forebrain, hippocampus and striatum (Staines *et al.*, 1994), our work raised the possibility that CP could have a similar organizational role on neurons in the cerebral cortex as in the cerebellum. This role could involve some common mechanisms. For instance, we reported the existence of CP binding sites on P19 neurons (Maltais *et al.*, 2003) and such sites could be present on cerebellar neurons as well. Indeed, the 1A1 anti-CP antibody bound to glial cells and blocked their interaction with neurons in cerebellar explants (Mittal et David, 1994b). However, the study of Mittal and David (Mittal and David, 1994) did not evaluate the possible influence of CP on the reelin profile or the involvement of a proteolytic activity in the action of CP on cerebellar neurons.

The assessment of the biological meaning of the action of CP on reelin is limited at the moment. This is due to the incomplete knowledge concerning the roles of the different reelin fragments and the proteases responsible for their generation. However, some information is available. For instance, studies have revealed that the central sequence, located between the



N-t and C-t processing sites, is necessary and sufficient for the binding of reelin to ApoER2 and VLDLR as well as for the phosphorylation of Dab1 (Jossin *et al.*, 2004). On the other hand, the N-terminal and the C-terminal regions are each required for full activation of this signaling pathway (Kohno *et al.*, 2009b ; Nakano *et al.*, 2007). By inducing generation of 300K reelin lacking the native C-terminus, CP could modulate reelin signaling. Reelin fragments have been proposed to diffuse more easily than the 400K species within tissues *in vivo* (Jossin *et al.*, 2004), raising the possibility of actions at distance of the reelin secretion sites. Perhaps, they could also have roles not related to Dab1 signaling (Hibi and Hattori, 2009). By stimulating reelin cleavage, CP could generate species of greater diffusibility and/or different function compared to the native reelin. The protease responsible for the generation of 180K reelin is a metalloprotease (Jossin, Gui et Goffinet, 2007 ; Kohno *et al.*, 2009a). This metalloprotease binds to heparin but further characterization was hampered by the enzyme instability (Kohno *et al.*, 2009a). Nothing is yet known on the protease responsible for the generation of 300K reelin. We have envisaged that the cleavage of reelin at the C-t site in the P19 model could be done by the serine protease involved in CP-induced neuroaggregation. However, this can neither be ascertained nor refuted since CP influences on neuronal organization and reelin profile were not dissociated in this study. Nevertheless, the P19 cell model could help identifying the protease acting at the reelin C-t site.

The relative levels of the reelin forms, not yet thoroughly investigated in the embryo, have been analyzed in some neurological diseases (Herz et Chen, 2006). Circulatory levels of 400K and 300K reelin were higher in schizophrenic compared to normal subjects, and those of 400K, 300K or 180K decreased in autistic and bipolar disorders (Fatemi, 2005b ; Fatemi, Kroll et Stary, 2001 ; Fatemi *et al.*, 2005). The observation that some neurological symptoms are associated with abnormal iron or copper levels have led to study CP levels in various neurological disorders. Like for reelin, CP levels change in some of these disorders. It seems that decreased levels of CP (or ferroxidase activity) in the serum or the cerebrospinal fluid accompany neurodegenerative conditions such as those encountered in Parkinson's and Alzheimer's diseases (Boll *et al.*, 2008). In contrast, there have been reports of higher circulating CP levels in schizophrenia, a syndrome associated with neuronal development (Wolf, Kotun et Meador-Woodruff, 2006). The biological significance of CP rise in this

disorder is not known but antioxidant protection, iron or copper regulation or even CP-catalysed neurotransmitter oxidation have been proposed. That circulatory 300K reelin was also more elevated in schizophrenic subjects would be in line with the upregulation of this reelin species by CP treatment in the P19 cell model. However, the reported CP levels found in schizophrenia have been heterogenous, perhaps influenced by the stage of illness (Wolf, Kotun et Meador-Woodruff, 2006). Another point not yet considered is that changes in circulatory CP may not necessarily correspond to similar changes in brain CP. Further investigations are required to better document potential relationships between CP and reelin expression in the nervous system. Until now, no anatomical defect of neuronal organization has been reported in CP-deficient mice and humans. However, motor or cognitive defects have been noticed in CP knockout mice (Patel *et al.*, 2002) and in a relatively large proportion of hereditary aceruloplasminemia subjects (McNeill *et al.*, 2008).

Substrates of the neuroaggregation-associated protease are not known. CP itself can be discarded. Adhesion molecules at the plasma membrane or in the extracellular matrix are potential candidates. CP did not detectably upregulate extracellular proteolytic activity in neuronal cultures using the general casein substrate. However, we cannot rule out activation of very small quantities of a specific protease. Other possible roles of CP could be to stimulate the production of the protease substrates or to bring together the protease and its substrate(s) in a surface-mediated mechanism. Such assistance to the cleavage of substrates is provided by factors V and VIII in the blood coagulation cascade, and CP displays important amino acid sequence homology with these factors (Pemberton *et al.*, 1997). Factors V and VIII were not involved in neuroaggregation since they were absent in our CP enriched (283-fold) preparations (Mateescu *et al.*, 1999). In fact, these factors accounted for less than 1% the amount found in bovine plasma as analyzed by the Laboratory of Hemostasis of Ste-Justine Hospital (Montreal, QC, Canada) using chronometric assays (STAR-Evolution system, Stago, Abbott, Mississauga, ON, Canada).

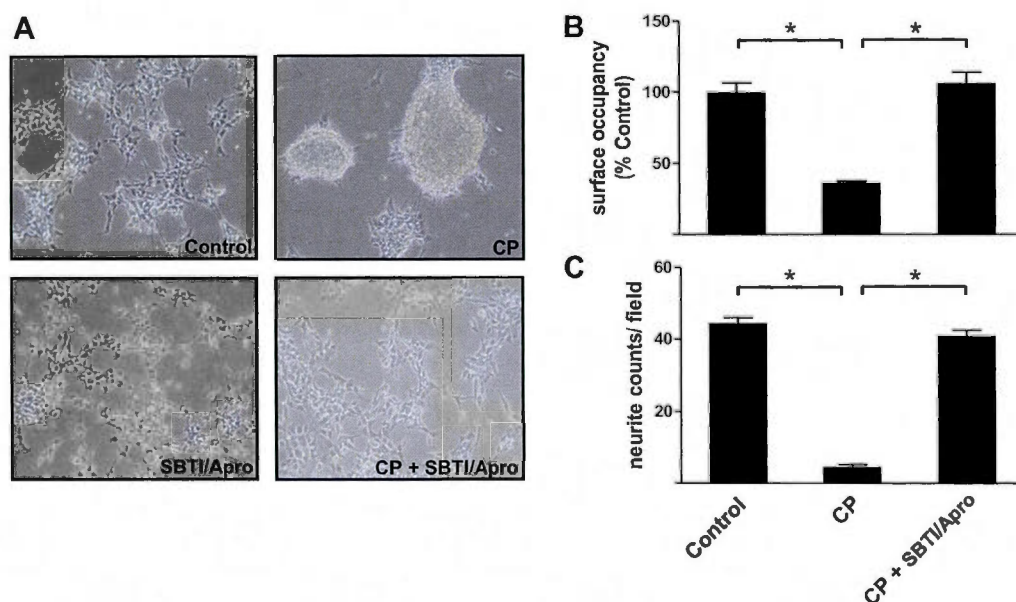
In conclusion, CP induces aggregation of P19 neurons through the involvement of serine protease activity and stimulates the cleavage of reelin at the C-t site. This apparent link between CP action and reelin expression in the P19 cell differentiation model in conjunction

with the inhibitory action of anti-CP antibody on neuronal migration *in vitro* and the reported variations in CP levels in neurological disorders suggest a probable role of CP in nervous system development. Physiological mechanisms of this link, including identification of the serine protease mediator, require further investigations. The P19 model can provide a useful tool to study some of these aspects.

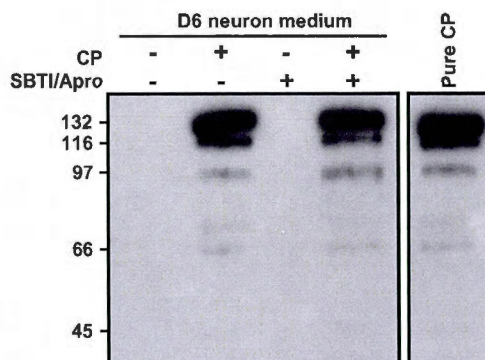
## **6.7 Acknowledgments**

We thank Dr. Johannes Nimpf (University of Vienna, Vienna, Austria) for the generous gift of ApoER2  $\alpha$ 20 antibody. We also thank Mrs. Anik Cormier (Ste-Justine Hospital, Montreal, QC, Canada) for performing analysis of factors V and VIII on CP preparations and bovine plasmas. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Studentships afforded to P.D. (Centre BioMed, UQAM), D.M. (NSERC) and D.D. (UQAM) are gratefully acknowledged. The authors have no conflict of interest.

## 6.8 Figures

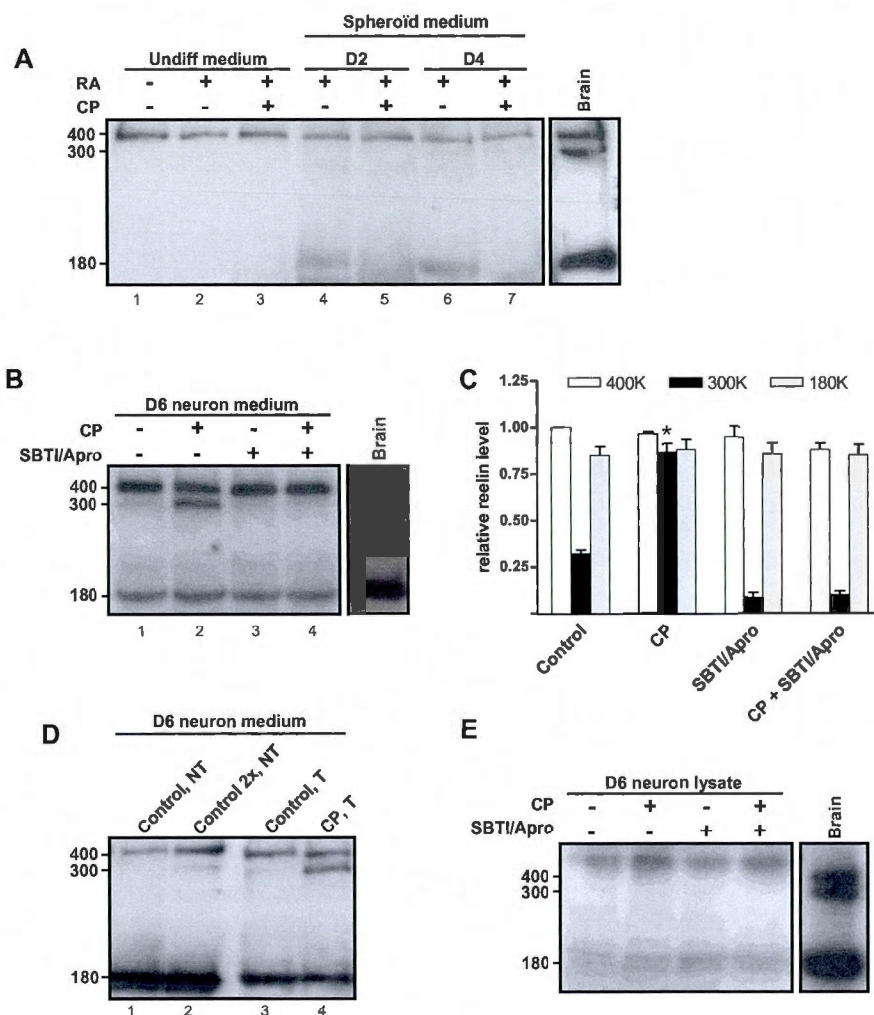


**Figure 6.1 A serine protease activity is involved in the neuroaggregative action of CP.** Day 4 P19 neurons were plated onto gelatin-coated dishes containing maturation medium, and incubated for 48 h without (control) or with CP (0.5 mg/mL), SBTI (100  $\mu$ g/mL) and Apro (30  $\mu$ g/mL). **(A)** Photographs (100X) of cultures. Notice the similar cell spreading in control and SBTI/Apro-treated cultures. **(B,C)** Action of SBTI/Apro on the effect of CP on surface occupancy and neuritic deployment. The values are expressed as means  $\pm$  SEM of three independent studies (\* indicates a significant difference,  $p < 0.05$ ). Une version électronique est fournie (CD).

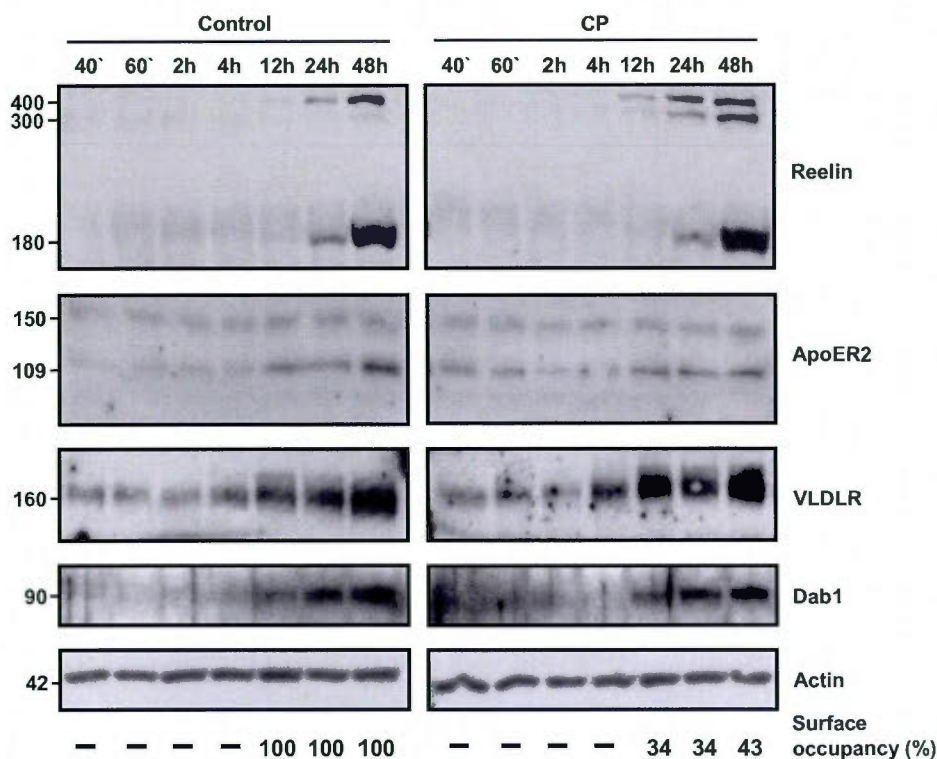


**Figure 6.2 CP is not targeted by the proteolytic activity.** Cells were treated without or with CP, SBTI and Apro from day 4 to day 6 of the neurodifferentiation protocol, and their culture media analysed for CP by Western blotting. An aliquot of the CP preparation (pure CP) was included for comparison; the aliquot applied corresponded to 100% undegraded CP in the culture samples. On the left, molecular weights (kDa) of immunoreactive bands. Results are representative of three independent studies. Une version électronique est fournie (CD).

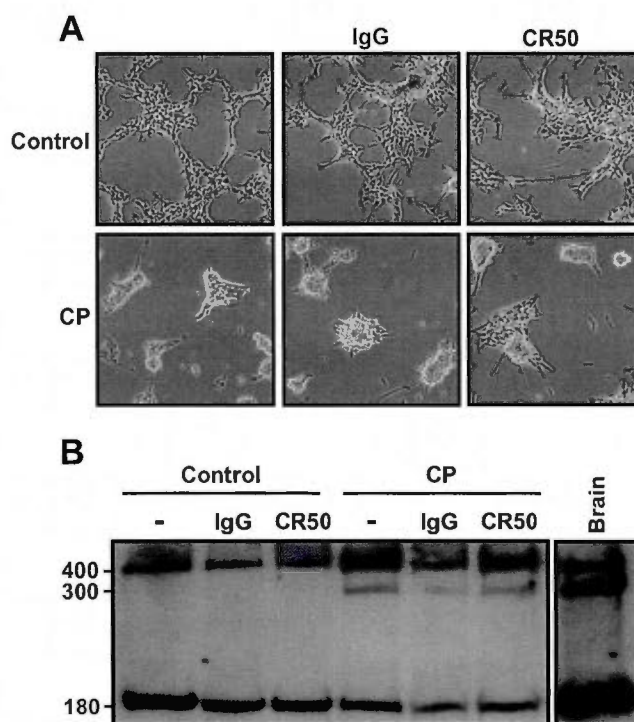




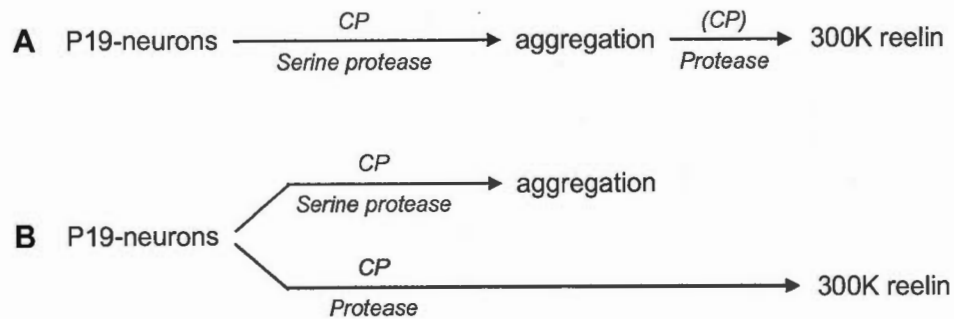
**Figure 6.3 Reelin is produced in P19 cell model and its profile modified in CP-induced neuroaggregation.** (A) The culture medium of undifferentiated (Undiff) cells collected after 48 h of culture and that of cell spheroids collected at days 2 and 4 of the neurodifferentiation protocol (neuroinduction in the presence of 0.5  $\mu$ M RA) were analysed by Western blotting using G10 antibody. CP was absent or present (0.5 mg/mL) during the 48 h of culture. Rat brain extracts were used as the positive control. An immunoblot is shown, with the sizes of immunoreactive bands (kDa) indicated on the left. (B,C) Day 4 neurons were treated for 48 h without (Control) or with CP, SBTI and Apro. A representative reelin immunoblot of the culture media, and the densitometric values of the reelin species standardized to 400K of control cultures (means  $\pm$  SEM of three independent studies). \* indicates a significant difference with the corresponding reelin species in the other cultures ( $p < 0.05$ ). (D) Trypsinized (T) and not trypsinized (NT) day 4 neuronal spheroids were plated into tissue culture dishes, incubated without (Control) or with CP for 48 h, and their culture media analysed by reelin immunoblotting. 2X indicates plating with two times more cells. (E) Reelin immunoblots of cell lysates corresponding to the neuronal culture media shown in (B). Une version électronique est fournie (CD).



**Figure 6.4 Time course of reelin, ApoER2, VLDLR and Dab1 protein expression, and of neuroaggregation.** Day 4 neuronal cultures were collected at different times of treatment without (Control) or with CP, and analyzed by immunoblotting for reelin (culture media) and for ApoER2, VLDLR and Dab1 (cell extracts). Protein assay (not shown) and actin probing indicated similar recovery of cellular proteins in control and CP-treated cultures. Control and CP-treated cultures are on the same blot. Extent of neuroaggregation is expressed as percentage of surface occupancy with respect to corresponding control culture. Results are representative of three independent studies. Une version électronique est fournie (CD).



**Figure 6.5 Neuroaggregation and the generation of 300K reelin induced by CP are not inhibited by the CR50 reelin function blocking antibody.** Day 4 neurons were incubated in absence or presence of mouse IgG or CR50 antibody during their 48 h-treatment without (Control) or with CP, and analyzed for morphology and reelin expression. Photomicrographs (100X) of cultures (A). Reelin immunoblots of culture media, beside those of brain extracts (B). Several regimens of antibody administration (bolus at time zero or cumulative additions) were tried with independent cultures and gave similar results. The results shown in this figure were obtained by cumulative additions of 3  $\mu\text{g}$  of the antibody at 0, 6, 20 and 28 h of CP treatment, achieving a final concentration of 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Une version électronique est fournie (CD).



**Figure 6.6 Possible relationships between CP-induced neuroaggregation and reelin cleavage.** Reelin cleavage can either be (A) a consequence of, or (B) a parallel slower event to, CP-induced neuroaggregation. In both cases, CP is a triggering factor. The protease responsible for reelin cleavage could be or not the one involved in neuroaggregation. Une version électronique est fournie (CD).

## **CHAPITRE VII : L'EXPRESSION DE LA REELINE 300K ET DE LA PHOSPHO-COFILINE EST RÉDUITE DANS LE CERVEAU EN DÉVELOPPEMENT DE SOURIS DÉFICIENTES EN CP**

Le travail de ce chapitre sera prochainement soumis à la revue *PLoS One* ou *European Journal of Neuroscience*, par Philippe Ducharme et Joanne Paquin (revue potentielle).

Ce chapitre concerne les profils d'expression ontogéniques de la CP, la reeline et la cofiline et ce, à partir de cerveaux de souris de type sauvage et de souris déficientes en CP. Le résultat principal est l'observation que la reeline 300K est bien moins abondante chez les souris  $CP^{-/-}$ , un résultat tout à fait en accord avec les observations faites dans le modèle P19. Les souris  $CP^{-/-}$  ont aussi des niveaux affaiblis de phospho-cofiline.

La planification expérimentale, la gestion de l'élevage des colonies de souris, la réalisation des expériences, le traitement des données expérimentales, la recherche bibliographique, le montage des figures ainsi que la rédaction du manuscrit ont tous été réalisés par P. Ducharme sous la supervision du Dre J. Paquin.



## 7.1 Résumé

La céruloplasmine (CP), une ferroxidase extracellulaire, agit comme principal régulateur dans le métabolisme du fer. La CP pourrait également participer à l'organisation spatiale des neurones du cerveau en développement, tel que suggéré par ses effets *ex vivo* sur des neurones naissants issus de cellules souches murines P19. En effet, la CP induit l'agrégation de ces neurones et modifie le profil d'expression protéique de la reeline, une glycoprotéine extracellulaire essentielle au bon positionnement des neurones au cours du développement du cerveau. Dans le cerveau adulte, la reeline est exprimée sous forme d'un polypeptide natif de 400K ainsi que sous forme de fragments de 300K et 180K, trois formes qui comportent toutes l'extrémité N-terminale native. Le profil ontogénique de la reeline et de ses fragments est largement inconnu mais, dans le modèle neuronal P19, la CP stimule la génération du fragment de 300K. Une des cibles connues de la signalisation médiée par la reeline est la cofiline, une protéine régulatrice de l'assemblage de l'actine cytosquelettique et dont le niveau de phosphorylation diminue chez les souris déficientes en reeline. Pour déterminer si la CP peut influencer l'expression de la reeline ou celle d'une de ses cibles signalétiques dans le cerveau en développement, nous avons comparé, par immunobuvardage, les profils ontogéniques de la CP, la reeline et la cofiline, dans les cerveaux de souris de type sauvage et ceux de souris déficientes en CP. Chez les souris de type sauvage, la CP est détectée dès le jour embryonnaire 12.5. Les niveaux protéiques de la CP augmentent jusqu'à la naissance et demeurent soutenus jusqu'à l'âge adulte. L'expression protéique totale de la reeline suit celle de la CP mais les niveaux de reeline 300K sont plus élevés durant la période embryonnaire comparativement à ceux après la naissance. D'autre part, la cofiline est nettement plus phosphorylée au cours de la première semaine postnatale. Il est frappant de constater que chez les souris déficientes en CP, la reeline 300K est faiblement détectée avant la naissance et que la déphosphorylation de la cofiline survient plus tôt au cours de la période postnatale, en comparaison avec les souris de type sauvage. Collectivement, ces résultats appuient l'hypothèse d'un rôle de la CP dans le développement du cerveau, de par ses incidences sur le clivage de la reeline ainsi que sur une cible connue de la reeline.

*Manuscript*

**THE EXPRESSION OF 300K REELIN AND PHOSPHO-COFLIN IS  
REDUCED IN THE DEVELOPING BRAIN OF CERULOPLASMIN-  
DEFICIENT MICE**

**Philippe Ducharme and Joanne Paquin\***

*Département de chimie et de biochimie and Centre BioMed, Université du Québec à  
Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec) H3C 3P8, Canada*

\*Address correspondence and reprint requests to : Dr. Joanne Paquin, Département de chimie et de biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec) H3C 3P8, Canada, Phone : (514) 987-3000, ext. 4990, Fax : (514) 987-4054, E-mail : [paquin.joanne@uqam.ca](mailto:paquin.joanne@uqam.ca)

**Footnotes**

**Abbreviations used:** ApoER2, apolipoprotein E receptor-2 ; CNS, central nervous system ; CP, ceruloplasmin ; CR; Cajal-Retzius; Dab-1, disabled-1 ; E, embryonic day ; GPI, glycosylphosphatidyl-inositol ; K, kDa; LIMK1, LIM kinase-1 ; PBS, phosphate buffer saline ; p-cofilin, phospho-cofilin ; P, postnatal day ; p-cofilin, phospho-cofilin; PW, postnatal week ; qPCR, quantitative polymerase chain reaction ; SDS, sodium dodecylsulfate ; TX, Triton X-100; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor.

## 7.2 Abstract

Ceruloplasmin (CP) is an extracellular ferroxidase that regulates iron metabolism. CP could also have a role in the spatial organization of neurons in the developing brain, as suggested by its *ex vivo* effects on nascent neurons derived from mouse P19 stem cells. Indeed, CP induces aggregation of these neurons and, furthermore, modifies their expression profile of reelin, which is a secreted glycoprotein essential to the correct positioning of neurons during development. In adult brain, reelin exists as 400K, 300K and 180K species bearing the native N-terminus. The ontogenic profile of these reelin species is largely unknown but, in P19 neurons, CP stimulates the generation of 300K reelin. One target of reelin signaling is regulator of actin dynamics cofilin, the phosphorylation of which is diminished in reelin-deficient mice. To determine if CP could influence reelin expression or signaling target in brain development, we compared, by immunoblotting, the ontogenic profiles of CP, reelin and cofilin in brains of wild-type and CP-deficient mice. In wild-type mice, CP expression started on embryonic day 12.5, increased until birth and remained sustained until adulthood. Global reelin expression almost followed that of CP but levels of 300K reelin were much higher before than after birth. Cofilin was markedly phosphorylated over the first postnatal week. Strikingly, in CP-deficient mice, 300K reelin was poorly detectable before birth and cofilin was dephosphorylated sooner postnatally compare to wild-type mice. Collectively, these results support a role of CP in brain development through an impact on reelin processing and target.

**Keywords:** Nervous system development, brain ontogenesis, copper protein, immunoblotting, alopecia, P19 embryonic carcinoma cells

### 7.3 Introduction

Ceruloplasmin (CP) is a 132 kDa (132K) blue copper ferroxidase that was traditionally known to be synthesized and secreted into the blood circulation by liver. About fifteen years ago, CP was discovered to be synthesized also in brain, as a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-modified protein anchored to the surface of glial cells (Klomp *et al.*, 1996 ; Patel et David, 1997). The secreted and GPI-modified forms originate from the same gene through alternative RNA splicing (Patel, Dunn et David, 2000 ; Yang *et al.*, 1990). CP has an important regulatory role in iron homeostasis. Indeed, in humans and mice, CP deficiency leads to massive deposition of iron in organs, including brain where this phenomenon correlates with neuronal pathology and death (Harris *et al.*, 1995 ; Kono, 2012 ; Patel *et al.*, 2002 ; Rathore *et al.*, 2008). Further investigation showed that CP mobilizes ferrous ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ) exiting cells and oxidizes them to ferric ions ( $\text{Fe}^{3+}$ ) for incorporation into proteins such as transferrin (Jeong et David, 2003 ; Kono, 2012). CP also provides cytoprotection in oxidative stress conditions (Aouffen *et al.*, 2001 ; Atanasiu *et al.*, 1995 ; Jeong et David, 2006 ; Paradis *et al.*, 2010 ; Rathore *et al.*, 2008).

Beside its roles in iron metabolism and antioxidant defence, CP could have a role in the spatial organization of neurons during brain development as suggested by *ex vivo* studies. First, by analyzing postnatal rat cerebellar microexplant cultures treated with an antibody that blocks the function of CP, David's group concluded that endogenous CP can promote the adhesion and migration of neurons onto radial glial cells, which form fibers that help neurons to find their place in developing brain (Mittal *et al.*, 2003 ; Patel et David, 1997). Second, our studies on nascent neurons derived from mouse P19 embryonic carcinoma cells showed that exogenously-brought CP induces neuron aggregation and, furthermore, modifies the expression profile of reelin, a protein essential to the correct positioning of neurons in brain (Ducharme *et al.*, 2010 ; Maltais *et al.*, 2003). Reelin exists under three species that bear the native N-terminus : full-length 400K polypeptide, 300K fragment and 180K fragment (Jossin, Gui et Goffinet, 2007), and CP stimulated the generation of 300K reelin in P19 neuronal cultures (Ducharme *et al.*, 2010).

A basal requirement for a role of CP in brain development is expression of CP in this organ during this process. Ontogenic data on CP protein expression in brain are almost non-existent although CP mRNA has been detected in rat brains before and after birth (Chang *et al.*, 2005 ; Thomas, Schreiber et Jaworowski, 1989). Otherwise, CP protein has been detected since embryonic day (E) 10 in rat yolk sac, serum, and amniotic fluid, and from E15 in rat liver (Gorbunova et Baranov, 1984 ; Puchkova *et al.*, 1994). Similar results were obtained in zebrafish embryo (Korzh, Emelyanov et Korzh, 2001).

Reelin, a glycoprotein secreted by specialized neurons, is a major regulator of neuronal migration and positioning in developing brain (D'Arcangelo *et al.*, 1995 ; Forster *et al.*, 2010). The lack of reelin, which characterizes the *reeler* mouse, results in severe cytoarchitectural defects in neocortex, hippocampus, cerebellum and brain nuclei such as the substantia nigra (D'Arcangelo *et al.*, 1995 ; Frotscher *et al.*, 2009 ; Nishikawa *et al.*, 2003 ; Stanfield et Cowan, 1979). Little is known on the expression of 400K, 300K and 180K reelin species during development because most ontogenic studies done so far were based on mRNA analysis or on histochemistry approach using an antibody that recognizes all these reelin species (Alcantara *et al.*, 1998 ; Bernier *et al.*, 2000 ; D'Arcangelo *et al.*, 1995 ; Frotscher *et al.*, 2009 ; Goffinet *et al.*, 1999 ; Ikeda et Terashima, 1997 ; Tissir, Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2002).

Reelin acts by binding to apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) and the very low-density lipoprotein receptor (VLDLR) (D'Arcangelo *et al.*, 1999), which in turn activate the intracellular protein adaptor Disabled-1 (Dab-1) (Hiesberger *et al.*, 1999 ; Howell, Herrick et Cooper, 1999). Downstream details of reelin signaling are not completely known. However, cofilin has been recently identified as a target of reelin action (Chai *et al.*, 2009a, 2009b). Cofilin binds to filamentous (F)-actin and promotes its disassembly into globular (G)-actin. Cofilin is inactivated following its phosphorylation on serine 3 by LIM kinase 1 (LIMK1), and this modification leads to accumulation of F-actin and stabilization of the actin cytoskeleton (Arber *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1998). The level of phospho-cofilin (p-cofilin) is reduced in *reeler* mice compared to normal mice, and reelin was shown to stimulate the phosphorylation of cofilin *ex vivo*, through a mechanism that would involve ApoER2, Dab1



and LIMK1. It has been proposed that reelin-induced stabilization of the cytoskeleton through p-cofilin could be required for the directional migration of neurons at specific developmental stages (Chai *et al.*, 2009a, 2009b).

We undertook the present work to get *in vivo* evidence of an existing relationship between CP and reelin processing and/or target in brain development. Specifically, we use western blotting approach to analyse CP expression in mouse brain extracts from embryonic ages to adulthood, and to compare reelin processing and cofilin phosphorylation in brain extracts of wild type mice and CP-deficient mutant mice (CP<sup>-/-</sup>). Our results provide new information on CP, reelin and p-cofilin expression during brain ontogenesis. They also show differences in reelin and p-cofilin expression in wild-type and CP<sup>-/-</sup> mice, and thus support a plausible role of CP in brain development.

## 7.4 Experimental procedures

### 7.4.1 Animals and brain samplings

Few couples of C57BL/6 wild type mice, purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada), and of C57BL/6-CP<sup>-/-</sup> mice, generously provided by Dr. Samuel David (Centre for Research in Neuroscience, McGill University, Montreal, QC, Canada), were used to generate the required number of descendants of each phenotype. Creation of the mouse CP<sup>-/-</sup> line had been previously described (Patel *et al.*, 2002). Animal breeding and experimental procedures followed the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and have been approved by the Animal Care Committee of the Université du Québec à Montréal (Montreal, QC, Canada). Mice had an *ad libitum* access to water and food. Newborn pups were housed with their mother until weaning at about three weeks after birth. The day of finding a vaginal plug after mating males and females was defined as E0.5. Brains of wild type and CP<sup>-/-</sup> animals were collected on E10.5, 12.5, 14.5 and 17.5 as well as on postnatal day (P) 1, 4, 7 and 10, and postnatal week (PW) 2, 3, 4, 5, 6 and 7. Efforts were made for minimizing animal number utilization. Brains of all embryos of a pregnant mouse were pooled to constitute one sample of a given embryonic age. However, the embryos of three pregnant mice were necessary to generate one E10.5 brain sample of analysable size. Postnatally, each

pup corresponded to one brain sample. Pups of a given litter were picked up one at a time at different postnatal ages. Therefore, brain samples of any developmental time came from different litters.

#### 7.4.2 Genotyping

Mouse genotypes were confirmed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis. DNA was isolated from ear punches using a commercial DNA Extraction Kit (Biobasic, Markham, ON, Canada) and following the manufacturer's protocol. qPCR analysis was performed on a LightCycler® Carousel-Based system equipped with RelQuant software (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Each reaction was carried out with a QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), following the manufacturer's instructions, and contained 2  $\mu$ L of DNA extract and 0.25  $\mu$ M of combined forward and reverse specific primers (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada). CP primers were designed in the first exon of the gene with PrimerQuest software (accession number BC062957): GGCCACAGGGAAGTGTGTTTGT (forward) and TCTCGGAGCCCACGATGCAATAAA (reverse). The primer sequences of  $\beta$ -actin, used as an endogenous standard, were taken from Krook *et al.* (Krook *et al.*, 2002): GCCCTGGCTCCTAGCACC (forward) and CCACCAATCCACACAGAGTACTTG (reverse). DNA samples from wild type and CP<sup>-/-</sup> mice were analysed together in the same assay. Fifty cycles at 60°C enabled development of the exponential amplification phase and the qPCR products were then analysed by electrophoresis in 1.5 % agarose gels, using DNA ladder (BioShop, Burlington, ON, Canada) as DNA size markers.

#### 7.4.3 Brain extracts

For postnatal samplings, mice were anesthetised with isoflurane (Pharmaceutical Partners of Canada Inc., Richmond, ON, Canada) on the day of interest, euthanized with CO<sub>2</sub>, and their brain immediately collected and put in ice-cold homogenization buffer (20 mM potassium phosphate, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 1% v/v Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM orthovanadate, 1 mM NaF and protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich); 1 mL buffer per g of tissue). For prenatal samplings, pregnant mice of the desired gestational day

were anesthetised and euthanized as indicated above, before removing embryos from uteri. Brains were gently dissected from embryos and collected in ice-cold PBS containing protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitors orthovanadate (1 mM) and NaF (1 mM). All brain samples were homogenized with a hand-driven potter, at 4°C, in homogenization buffer. The homogenates were incubated on ice for 1 h and centrifuged at 100 000 g, at 4°C, for 1 h. The resulting supernatants, which corresponded to Triton X-100 soluble protein extracts (TX extracts), contained reelin, cofilin and diffusible CP. GPI-anchored CP was extracted from pellets using conditions described by Mostad and Prohaska (Mostad et Prohaska, 2011). Pellets were carefully washed with homogenization buffer, sedimented again by centrifugation and resuspended in homogenization buffer containing 4% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS). These SDS extracts were clarified by centrifugation. Samples were stored at -20°C until analysis of CP, reelin and cofilin by Western blotting.

#### **7.4.4 Cofilin phosphorylation in P19-derived neurons treated with CP**

CP was purified from bovine plasma by fractionated precipitation with ammonium sulfate followed by chromatography on aminoethyl-agarose (Aouffen et al., 2001 ; Atanasiu et al., 1995 ; Ducharme et al., 2010 ; Maltais et al., 2003). CP preparations were pure as confirmed by A610nm/A280nm values greater than 0.04 and homogeneous electrophoretic protein profiles.

P19 stem cells were differentiated in neurons as described (Ducharme et al., 2010 ; Maltais et al., 2003). Briefly, cells were seeded in bacteriological-grade culture dishes and grown as floating spheroids, during 4 days, in the presence of 0.5 µM retinoic acid (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). On day 4, spheroids were dissociated and individualized cells (neurons at about 95%) were seeded in gelatinized tissue culture dishes containing Neurobasal medium supplemented with 2% v/v B27 (Invitrogen) and 0.5 mM L-glutamine. Neurons were then incubated for different times up to 8h, in the absence (Control) or presence of CP (0.5 mg/mL) in the culture medium. At end of incubation, neurons were washed with PBS and lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6, containing 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich), orthovanadate (1 mM) and NaF (1 mM). Lysates were clarified by

a 10 min-centrifugation at 10 000 g, 4°C, to obtain total protein extracts, which were stored at -20°C until analysis of cofilin by Western blotting.

#### 7.4.5 Western blotting

Protein contents in extracts were determined with a Micro Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis procedures were as described (Ducharme *et al.*, 2010) with few modifications. Briefly, protein samples (TX brain extracts or total P19 neuron extracts, 20 µg; SDS brain extracts, 40 µg) were loaded onto gels (12.5% polyacrylamide for cofilin, 10% for CP and 6% for reelin). Gels were run for 15 min at 100 V followed by 1 h at 150 V (35 min at 75 V followed by 1 h at 150 V for reelin), using a MiniProtean TetraCell assembly (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were then electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes for 35 min (2 h for reelin), using a Trans-blot SD system (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% (w/v) BSA (cofilin and CP) or 3% non-fat dry milk (reelin) in Tris buffer saline containing 0.1% Tween-20, before immunoblotting. Primary antibodies were used in the following dilutions: mouse anti-reelin G10 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), 1/1000; rabbit anti-human CP (Dako, Mississauga, ON, Canada), 1/1000; rabbit anti-cofilin (D59; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), 1/1000; rabbit anti-p-cofilin (mSer3; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 1/1000; and mouse anti-β-actin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 1/100 000. Secondary antibodies, conjugated to horseradish peroxidase, were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Immune complexes were revealed with Immobilon Western Chemiluminescent Substrate (Millipore, Nepean, ON, Canada) and exposition to HyBlot CL films (Denville Scientific Inc., Toronto, ON, Canada). Films were digitized using a Canon PIXMA MP480 scanner and analyzed by densitometry using Image J 1.43u software (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

#### 7.4.6 Statistics

Results are expressed as means  $\pm$  SEM of 3-5 independent experiments. Statistical analysis was done using Student's *t* test and the JMP IN 4.0.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and  $p < 0.05$  was used as the significance value.

### 7.5 Results

#### 7.5.1 Genotype and phenotype analysis of CP-deficient mice

Few couples of CP<sup>-/-</sup> mice, generously given by Dr. Samuel David (Centre for Research in Neuroscience, McGill University, Montreal, QC, Canada), provided the number of descendants needed for our work. Generation of this CP<sup>-/-</sup> mouse line had been previously described (Patel *et al.*, 2002). Briefly, the genomic sequence comprising the transcription start site and the first exon of the CP gene had been replaced by a sequence containing a *neo* gene cassette in the orientation opposite to that of the CP gene, a strategy that had eliminated any possible production of a truncated CP protein. Therefore, in this study, we designed primers that recognized the first exon of genomic CP to distinguish wild type and CP<sup>-/-</sup> mice by qPCR analysis. The qPCR product, generated with the appropriate size from wild type mice (197 bp), was absent in CP-deficient mice (Fig. 1A). We also confirmed the non-expression of CP in CP<sup>-/-</sup> animals by western blot analysis of brain extracts (Fig. 1B). It is worthy of note that all CP<sup>-/-</sup> animals we let live past two weeks after birth completely lost their fur between PW2 and PW3 and gained new fur from PW5 to PW6. This alopecia episode could be related to dysregulation of iron metabolism, as suggested by studies done on the impact of iron deficiency or iron administration on hair growth (Hirobe, 2009 ; Morokuma *et al.*, 2008 ; Vanderford *et al.*, 2010).

#### 7.5.2 Expression profile of CP protein during brain development

We investigated the expression profile of CP protein in brains of wild type mice from early stages of brain corticogenesis (E10.5) until adulthood (PW7). E10.5 was judged to be a good starting point since it corresponded to the time of apparition of reelin mRNA in mouse (Alcantara *et al.*, 1998 ; Ikeda et Terashima, 1997). RNase protection analysis had shown that liver synthesizes mainly the secreted form of CP whereas brain predominantly produces the



GPI-anchored species (Patel, Dunn et David, 2000). We used TX detergent to extract diffusible CP under conditions that extract reelin (di Patti *et al.*, 2009 ; Sinagra *et al.*, 2005). TX extracts thus contained CP synthesized as the secreted protein *de novo* but could also contain CP released from its GPI anchor. Indeed, hydrolysis of GPI has been reported to occur for other GPI-anchored proteins (Sharom et Radeva, 2004). Most GPI-anchored proteins are poorly solubilized from cell membranes by non-ionic detergent such as TX because they are found in specialized plasma membrane domains (Morandat, Bortolato et Roux, 2003 ; Schroeder, London et Brown, 1994 ; Schroeder *et al.*, 1998). We therefore used 4% SDS to extract GPI-anchored CP since these detergent conditions have been shown to work well with CP (Mostad et Prohaska, 2011).

Western blotting results of Figs 7.2A and 7.2C show that our method began to detect diffusible CP in mouse brain at E17.5. Levels of TX-extracted CP increased until P1 and remained high until at least PW7; there was a tendency of a slight decline after P10. A similar profile was observed for GPI-anchored CP that was extracted with SDS, except that detection occurred earlier, at E12.5 (Figs 7.2B,C), together with or soon after the stage of preplate formation which occurs between E11-E12 (Tissir et Goffinet, 2003). Both diffusible and GPI-anchored CP were detected as a unique band of approximately 132K (as expected) (Figs 7.2A,B). Both forms were also maximally expressed during the first postnatal week or so (P1 to P7-P10; Fig. 7.2C). We used cofilin as the protein loading control of TX extracts because the expression of actin varied in these extracts during development (see later) while that of cofilin was stable. We did not find a suitable protein control for SDS extracts. Caveolin would have been fine but its levels were too low to be useful. Instead, we used some bands that presented similar Coomassie blue staining between samples. It is worth noting that probing blots of SDS extracts with anti-cofilin antibody gave no signal, which indicates that these extracts were not contaminated by proteins normally extracted with TX (data not shown). Overall, the results demonstrated that CP protein is present during brain formation, a prerequisite to a role of CP in development of this organ.

### 7.5.3 Developmental profile of reelin protein species in wild type mouse brains

Reelin exists under three species that bear the native N-terminus : full-length 400K polypeptide, 300K fragment and 180K fragment (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1999). Many studies have documented reelin ontogenesis in mouse brain by immunohistochemistry and in situ hybridization approaches (Alcantara *et al.*, 1998 ; Ikeda et Terashima, 1997 ; Schiffmann, Bernier et Goffinet, 1997). They provided abundant informations on the sites of reelin expression throughout the time schedule of brain development. However, there are only partial informations on expression of different reelin protein species. For instance, either one, two or all three 400K, 300K and 180K reelin species have been detected in hippocampi of mouse neonates (Sinagra *et al.*, 2005) and prenatally in porcine frontal cortices (Nielsen *et al.*, 2010). In this work, we analyzed the expression of these reelin species in brain throughout both the prenatal and postnatal periods, until adulthood (PW7). This was done by western blotting using the antibody G10 that recognizes a N-terminal epitope in reelin (Jossin, Gui et Goffinet, 2007).

As shown in Figs 7.3A and 7.3B, all three reelin species became detectable at E12.5 in brain extracts of wild type mice, and their levels increased until birth. The 400K and 180K species remained present postnatally although there was a progressive decline from about PW3 to PW7, the last day analysed. Interestingly, the expression profile of 300K reelin greatly decreased soon after birth (P1) and remained low until P7. This was in contrast with the 400K and 180K reelin which were expressed at plateau levels during the same period. There was a small peak of 300K reelin expression postnatally, extending from P10 to PW3. The height of this peak was half that of the prenatal peak. Of the three reelin species, the 180K gave the strongest immunosignal. This could be due to higher expression levels compare to 400K and 300K or to a better recognition by G10 antibody.

### 7.5.4 Strong reduction of 300K reelin expression in embryonic CP<sup>-/-</sup> mouse brains

To determine whether CP could have an influence on reelin expression, we also analysed the expression profile of reelin species in brains of CP-deficient mice (Figs 7.3C and 7.3D). The 180K reelin profile in CP<sup>-/-</sup> mice resembled that seen in wild type mice with respect to

the overall shape and signal intensity. Although the overall shape of 400K reelin profiles was similar in both animal lines, the relative intensity of 400K signals to corresponding 180K signals was lower in CP-deficient than in wild type mice, particularly at both extremes of the time scale, that is before E17.5 and after PW3. Like 400K reelin, 300K reelin also gave less intense signals relatively to 180K in mutant than wild type animals. Strikingly, the strong 300K signals seen at E14.5 and E17.5 in wild type mice was almost extinguished in CP<sup>-/-</sup> mice whereas the postnatal peak of expression was conserved. Differences in embryonic 300K signals were confirmed by side-by-side analysis of embryonic brain samples from both animal lines. Indeed, Fig. 7.4 shows only traces of 300K reelin in CP<sup>-/-</sup> mice compare to wild type mice at E12.5, E14.5 and E17.5. There were also lower levels of 400K reelin at E12.5 and E14.5 in mutant compare to wild type mice while there were no appreciable differences in 180K expression between both animal lines at any time. These results would indicate that CP is somehow required for the generation of 300K reelin in embryonic brain.

#### 7.5.5 Reduction of cofilin phosphorylation in embryonic CP<sup>-/-</sup> mouse brains

We next focused on cofilin, a target of reelin action *in vivo*. Indeed, reelin has been shown to stimulate the phosphorylation of cofilin (Chai *et al.*, 2009a, 2009b). The ontogenic profile of cofilin in wild type mouse brains revealed stable levels of expression throughout development (Fig. 7.5A). In contrast, levels of p-cofilin varied. Most of the time, p-cofilin was below the detection limit in brain extracts. However, there were one episode of modest phosphorylation on early embryonic days (E10.5-12.5) and one episode of very intensive phosphorylation soon after birth (P1-P7) (Figs 7.5A,C). Phosphorylation of cofilin had been shown to induce accumulation of F-actin (Arber *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1998), a form of actin that would be less extractable with TX (Wang, Gregory et Barritt, 2000). Interestingly, the episode of intense cofilin phosphorylation was followed by decreased levels of TX-soluble actin. In CP<sup>-/-</sup> mice, strong cofilin phosphorylation also occurred on early postnatal days (Figs 7.5B,C). However, this episode was shorter, lasting until P4 instead of P7. This was confirmed by analysing, side by side, P1 and P7 samples from both animal lines (Fig. 7.4D). p-Cofilin was consistently below threshold detection in P7 brains of CP-deficient mice. Notice that, in accordance with shorter duration of cofilin phosphorylation, levels of detergent-soluble actin decreased sooner in CP<sup>-/-</sup> animals than in wild type animals (Figs

7.5A,B). Notice also the absence of the modest episode of cofilin phosphorylation on early embryonic days in CP-deficient mice compared to wild type mice (Figs 7.5A-C). Overall, CP appears to have an influence of cofilin phosphorylation in the developing brain.

#### 7.5.6 CP stimulates cofilin phosphorylation in nascent P19 neurons

CP influence on cofilin phosphorylation could be indirect, through a decreasing action on reelin expression, but it could also be independent of reelin. To investigate the possibility of a reelin-independent influence, we analysed p-cofilin in cultures of neurons derived from P19 stem cells. These cultures provide a model of neurons of the brain cortex since they contain neurons that resemble those of the forebrain, hippocampus and striatum (Cadet et Paquin, 2000 ; Finley, Kulkarni et Huettner, 1996 ; MacPherson *et al.*, 1997 ; Parnas et Linial, 1997a ; Staines *et al.*, 1994). In P19 neuronal cultures, reelin begins to accumulate at detectable levels in the culture medium approximately 12 h after cell seeding (Ducharme *et al.*, 2010). Fig. 7.6 shows that levels of p-cofilin progressively increased over the first 8h of culture in control neurons not treated with CP. Interestingly, compare to control neurons, neurons treated with CP showed significantly higher p-cofilin levels. These results do not prove but point to a possible reelin-independent influence of CP on cofilin phosphorylation.

### 7.6 Discussion

The extracellular copper protein CP is a main regulator of iron metabolism in the organism, including the brain. This is of vivid interest for the study of neurodegenerative diseases that are associated with dysregulation of brain iron, such as ataxias and Parkinson's disease (Dusek, Jankovic et Le, 2012). We previously observed that, *ex vivo*, CP bound to nascent neurons derived from P19 stem cells, induced their aggregation and stimulated their production of 300K reelin (Ducharme *et al.*, 2010 ; Maltais *et al.*, 2003). Considering that reelin has an essential role in the establishment of the brain cytoarchitecture, an influence of CP on reelin expression in neuronal cultures raised a possible role of CP in brain development. The present work was undertaken to get *in vivo* evidence of a relationship between CP and reelin expression in the developing brain. We also studied the expression of cofilin since it is a target of reelin signaling in brain. A salient feature of reelin expression in



wild type mice was the presence of high levels of 300K reelin from E14.5 to P1. Expression of 300K reelin even increased together with that of CP. Strikingly, during the same period, this reelin species was undetectable in CP-deficient animals, a finding in exquisite accordance with results obtained with P19 neurons *ex vivo*. The phosphorylation of cofilin has been shown to be reduced in reelin-deficient mice, raising the importance of cofilin activity in the regulatory role of reelin in neuron migration/positioning. There was also a reduction in p-cofilin levels in CP-deficient mice. Overall, the impact of CP deficiency on reelin and cofilin expression would militate for an implication of CP in brain development. In addition, this work revealed some peculiar features of reelin and p-cofilin expression in mouse brain ontogeny as well as it complemented knowledge on CP ontogenic profile.

The first sites of activation of CP synthesis as a secreted form in embryonic rodents have been reported to be the yolk sac at E8-9 and the liver at E12-15 (Baranov *et al.*, 1986 ; Gorbunova et Baranov, 1984 ; Puchkova *et al.*, 1994). These researchers also detected CP in the membrane fraction of extrahepatic tissues at E15. This membrane-associated form could correspond to the GPI-modified form, which had not yet been discovered at that time. In the present study, the apparition of membrane-anchored CP in mouse brain at E12.5 is in line with those past observations. With respect to mouse brain histogenesis, GPI-modified CP thus appears during the early stages of cortical development, concurrently with the phase of preplate/subplate formation and the production of reelin by Cajal-Retzius (CR) neurons located in cortical neuronal layer I (Alcantara *et al.*, 1998 ; Forster *et al.*, 2010 ; Tissir et Goffinet, 2003). CP apparition also coincides with the onset of radial glial cells, which guide the migration of neurons during the formation of additional cortical layers between E13 and birth (Tissir et Goffinet, 2003). We can imagine different ways by which CP could influence neuronal organization. First, like their counterparts in postnatal cerebellum (Mittal *et al.*, 2003 ; Patel et David, 1997), radial glial cells in embryonic cerebral cortex could express GPI-modified CP at their surface and bind neurons possessing CP acceptor/receptor sites. Second, considering that meningeal cells regulate the positioning of CR cells during corticogenesis (Borrell et Marin, 2006) and that some meningeal cells in the adult brain express GPI-modified CP (Mittal *et al.*, 2003), meningeal CP could influence the localization



of CR cells and hence the spatial distribution of reelin. After E12.5, CP protein expression in brain increased steadily until birth and remained constant until adulthood.

The expression of different reelin species in brain ontogenesis has little been investigated before. However, partial information exists. For instance, 400K, 300K and 180K reelin were detected in mouse hippocampus after birth (Sinagra et al., 2005) and in pig brain during embryogenesis (Nielsen et al., 2010). In the latter case, the 400K and 300K forms were not easily distinguishable one from the other. The present work shows that expression of the three reelin forms varies during brain ontogeny in wild type mice. The three forms are expressed early (E12.5). Levels of 400K and 180K forms (which contribute for the most part to overall reelin signal) then increased until birth and smoothly decreased until adulthood. This profile resembles that obtained at the mRNA level (Alcantara et al., 1998). The 300K reelin profile showed two episodes of high expression, one from E14.5 until birth and another one starting on PW1. Intriguingly, there was a shutdown of 300K reelin over the first week after birth, between the episodes of high expression. This has not been reported before, and mechanisms and impacts of this shutdown are thus to be determined. However, this phenomenon was accompanied by very high levels of p-cofilin, which raises the possibility that 300K reelin could be involved in the negative regulation of cofilin phosphorylation. This would be in line with the fact that 300K reelin lacks the C-terminal region of reelin that promotes optimal stimulation of Dab1 phosphorylation (Jossin, Gui et Goffinet, 2007 ; Jossin et al., 2004 ; Nakano et al., 2007) and possibly cofilin phosphorylation as well (Chai et al., 2009b, 2009a). Cofilin is an important regulator of actin cytoskeleton, the dynamics of which modulates various aspects of neuron development, including morphology, migration, polarization, synapse formation and function, and myelination (Bellenchi et al., 2007 ; Frotscher et al., 2009 ; Sparrow et al., 2012). Undue formation of F-actin in the brain, provoked by the knockdown of cofilin in neurons, impairs neuronal migration whereas reduced levels of F-actin in reeler mice can cause "over-migration" (Bellenchi et al., 2007 ; Kruger et al., 2010). It has been proposed that reelin-induced cofilin phosphorylation during the embryonic period could stabilize the actin-cytoskeleton through the conversion of G-actin into F-actin, and stop or halt neuron migration at specific moments during the formation of the nervous system (Frotscher et al., 2009 ; Kruger et al., 2010). Perhaps the strong

phosphorylation of cofilin in the first postnatal days provides adequate shape and stability to cells to undergo synaptic connection and maturation after they reach their correct position. There was another episode of cofilin phosphorylation which was modest and very early (E10.5-12.5). The role of this episode is not known but it could be necessary, for example, to orient neurons correctly before migration or, as inspired by results of cofilin knockdown, to control cell cycle during neurogenesis (Bellenchi et al., 2007). The assessment of the biological impacts of variations in levels of reelin species, in particular 300K reelin, is speculative at this moment due to incomplete knowledge concerning the roles of the different reelin fragments in general (Jossin, Gui et Goffinet, 2007 ; Jossin et al., 2004 ; Nakano et al., 2007) and in development in particular.

Analysis of CP-deficient mice led to correlate the presence of CP in the embryonic brain with the formation of 300K reelin. This correlation appears to be confined to the embryonic period since the postnatal peak of 300K reelin seen in wild type mice was also found in mutant mice. Reduced levels of 300K reelin (and to a less extent 400K reelin) observed in mutant embryos could compromise the normal function of reelin in the embryonic brain. Possibly however, defects could be modest in comparison to those seen in *reeler* mice completely devoid of functional reelin (D'Arcangelo et al., 1995 ; Frotscher et al., 2009). Our findings with *CP*<sup>-/-</sup> mice could have relevance to neurological disorders of developmental origin, such as schizophrenia, autism and bipolar disorder, since these disorders were found to be associated with variations in levels of reelin species (Fatemi, 2005b ; Herz et Chen, 2006) and CP (Wolf, Kotun et Meador-Woodruff, 2006). CP deficiency was also associated with reduced levels of p-cofilin perinatally. This effect could be a consequence of variations in expression of reelin species. However, data obtained with P19 neurons suggest that CP could also stimulate cofilin phosphorylation independently of reelin signaling. In line with this suggestion, p-cofilin was not totally abolished in *reeler* mice (Chai et al., 2009b), indicating that reelin is not the sole modulator of cofilin phosphorylation.

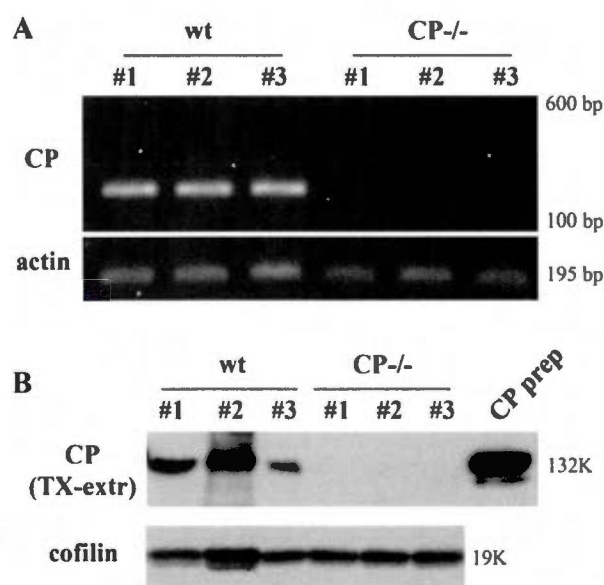
In conclusion, this study demonstrates that CP deficiency in the developing brain is associated with an impaired production of 300K reelin during embryogenesis and a shorter duration of cofilin phosphorylation perinatally. These findings add support to a role of CP in

brain development and validate results obtained with the P19 cell model. An exact definition of the role of CP would benefit from a better knowledge of the roles of the different reelin species and their mechanisms of their formation. In this respect, 300K reelin could present a particular interest since its ontogenic profile differs from that of 400K and 180K reelin. P19 neurons offer a simple model to investigate some mechanistic aspects of the links that exist between CP, reelin and cofilin.

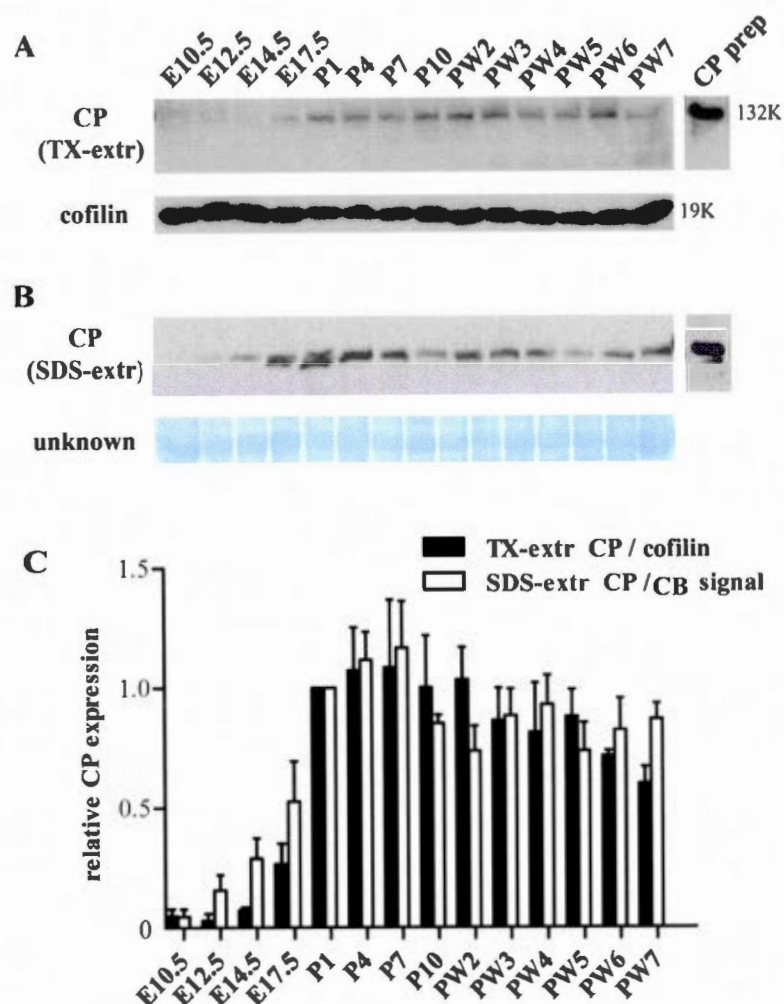
### **7.7 Acknowledgments**

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Studentships afforded to P.D. by the FARE program of the Université du Québec à Montréal (UQAM) and by the Centre de recherche biomédicale (BioMed) of UQAM are gratefully acknowledged. We are most grateful to Dr. Samuel David (Centre for Research in Neuroscience, McGill University, Montreal, QC, Canada) for the generous gift of CP<sup>-/-</sup> mice. We also thank Dr. Frédéric Bouchard, a former graduate student in our laboratory, for his help in qPCR analysis and for fruitful discussions. The authors have no conflict of interest.

## 7.8 Figures

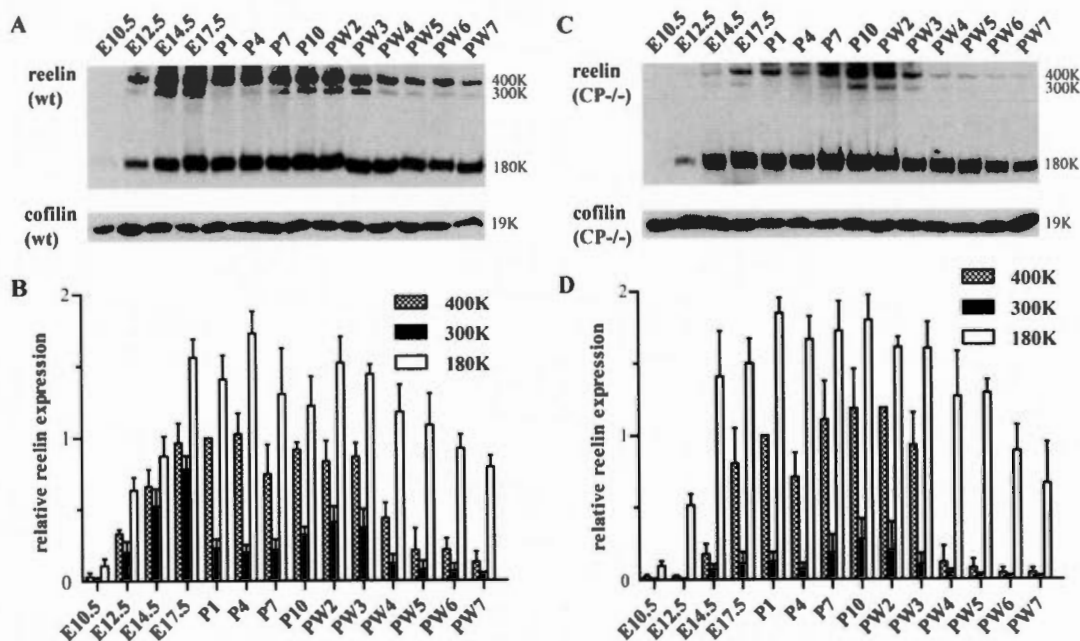


**Figure 7.1 Confirmation of the CP<sup>-/-</sup> phenotype.** (A) Analysis of genomic CP in wild type (wt) and CP<sup>-/-</sup> mice. Agarose gel profile of qPCR products obtained from three animals of different generations for each phenotype. Actin was used as an endogenous gene standard. The migration position of DNA size makers of 100 and 600 base pairs (bp) is indicated. (B) CP western blot of TX brain extracts obtained from three wild type and three CP<sup>-/-</sup> mice of different generations. Similar blotting results were obtained for SDS extracts. Cofilin was used as an endogenous standard of protein loads. CP prepared from bovine plasma served as the external positive standard. Une version électronique est fournie (CD).

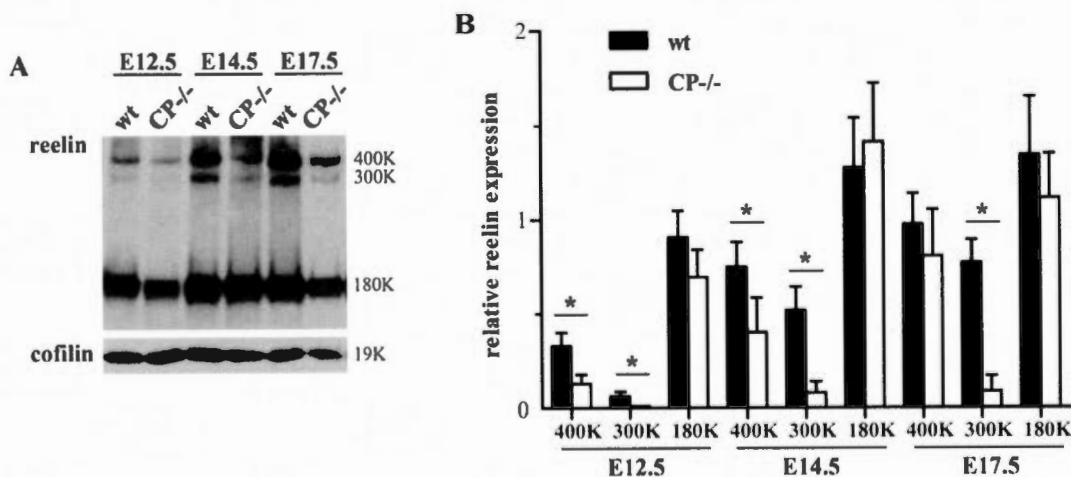


**Figure 7.2 Developmental protein profile of CP.** Brain extracts were obtained from wild type mice (wt) at the indicated developmental times and analyzed for CP expression by western blotting. (A) A blot specimen for TX extracts. Cofilin was used as an endogenous standard of protein loads. Bovine CP preparation served as the positive CP standard. (B) A blot specimen for SDS extracts (GPI-anchored CP). Coomassie blue (CB) staining was used to assess the similarity of protein loads between wells. One omnipresent stained band is shown. (C) Densitometric analysis of CP signals. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 5 independent samples per developmental time. The density of each CP signal was normalized to its corresponding cofilin or CB signal and reported relatively to CP, at P1, of the same gel. Une version électronique est fournie (CD).

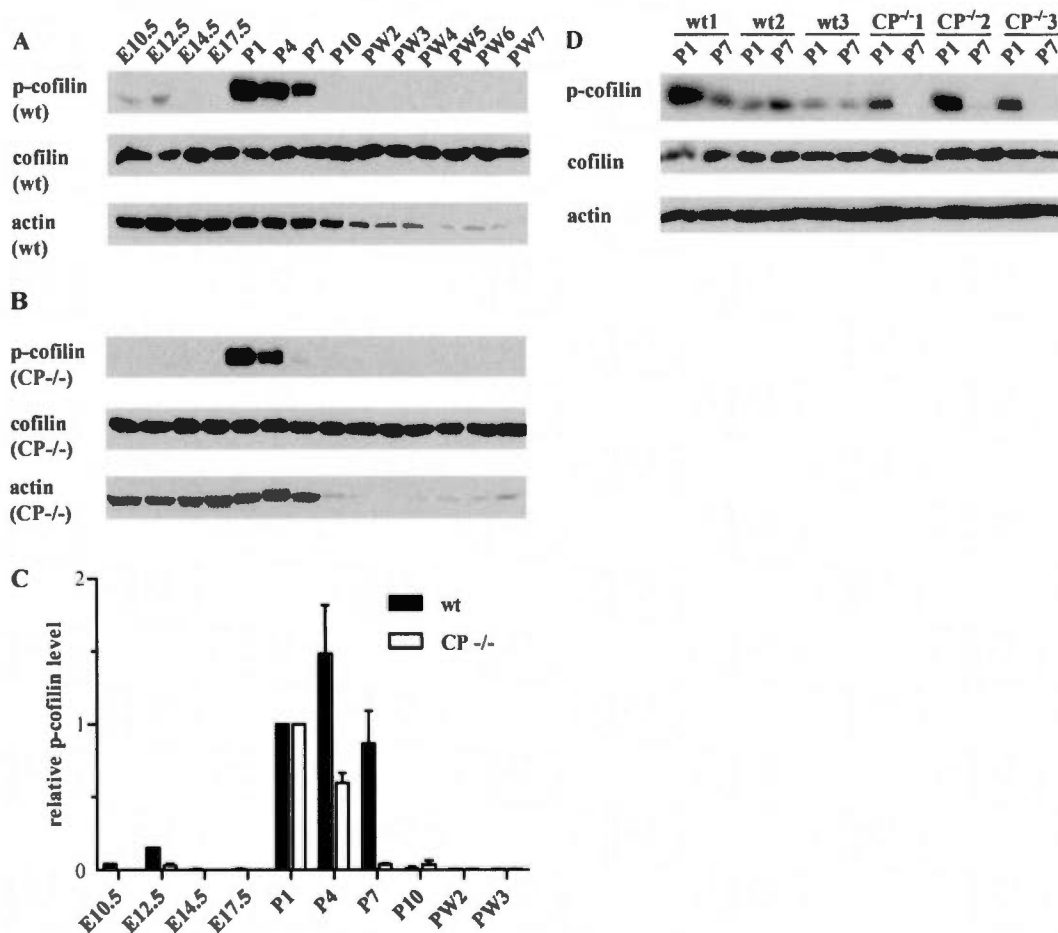




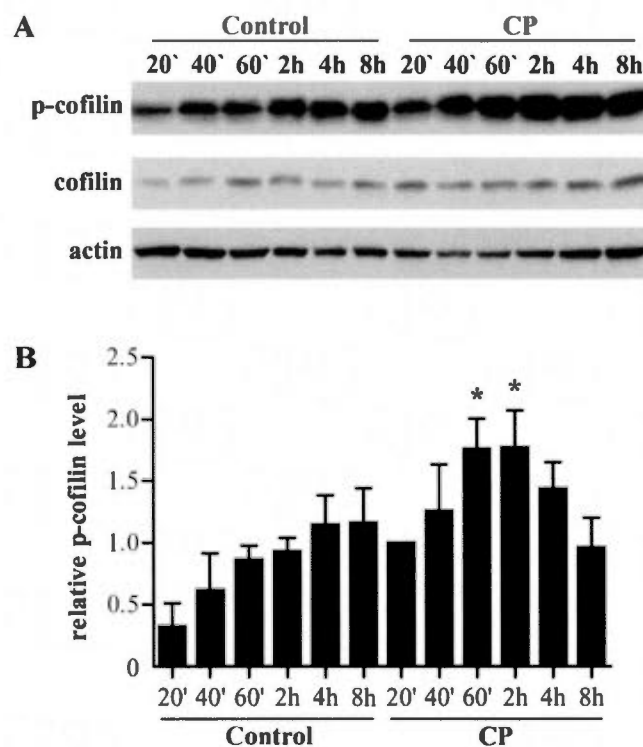
**Figure 7.3 Developmental protein profile of reelin in wild type and  $CP^{-/-}$  mice.** TX extracts were prepared from brains of wild type (wt) and  $CP^{-/-}$  mice at the indicated developmental times, and analyzed for reelin expression by western blotting. A blot specimen and densitometric data of (A,B) wild type animals and (C,D)  $CP^{-/-}$  animals. Cofilin served as an internal standard of protein loads. Densitometric data are expressed as means  $\pm$  SEM of 5 (wt) or 3 ( $CP^{-/-}$ ) independent samples per developmental time. The density of each reelin signal was normalized to its corresponding cofilin and reported relatively to 400K reelin, at P1, of the same gel. Une version électronique est fournie (CD).



**Figure 7.4 Direct comparison of reelin levels between wild type and CP<sup>-/-</sup> embryonic brains.** Reelin analysis was done as described in Fig. 3 except that brain samples of wild type (wt) and mutant mice were evaluated side by side on the same gel. (A) A blot specimen with cofilin used as a loading control. (B) Densitometric analysis. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 5 (wt) or 3 (CP<sup>-/-</sup>) independent samples per developmental time. The density of each reelin signal was normalized to its corresponding cofilin. \* indicates a significant difference between CP<sup>-/-</sup> and corresponding wt ( $p < 0.05$ ). Une version électronique est fournie (CD).



**Figure 7.5 Developmental protein profile of p-cofilin in wild type and CP<sup>-/-</sup> mice.** TX extracts were prepared from brains of wild type (wt) and CP<sup>-/-</sup> mice at the indicated developmental times, and analyzed for cofilin and p-cofilin expression by western blotting. Immunoblot specimens of one wild type (**A**) and one CP<sup>-/-</sup> (**B**) series. Actin expression is also shown. Notice the gradual disappearance of actin signal over the first 7 weeks after birth in both mouse lines. (**C**) Densitometric data (means  $\pm$  SEM) of 5 wild type and 3 mutant series done independently. Each p-cofilin signal is expressed relatively to its corresponding cofilin signal and normalized to P1 of the same gel. (**D**) Side by side comparison of p-cofilin levels in wild type and mutant brains at P1 and P7. Notice the large variations in p-cofilin levels at P1 in both animal lines and the absence of p-cofilin in all P7 mutant mice. Actin and cofilin levels were however similar at both developmental times and for both mouse lines. Une version électronique est fournie (CD).



**Figure 7.6 Time course of cofilin phosphorylation during treatment of P19 neurons with CP.** Neurons were incubated without (Control) or with CP and collected at the indicated times to analyze cofilin phosphorylation. **(A)** Immunoblot specimens showing p-cofilin and total cofilin as well as actin, which was used to verify similarity of protein loads. **(B)** Corresponding immunoblot densitograms (means  $\pm$  SEM of four independent studies). p-Cofilin is expressed relatively to total cofilin and normalized to corresponding CP sample at 20 min. \* indicates a significant difference with Control of the same time ( $p < 0.05$ ). Une version électronique est fournie (CD).

## **CHAPITRE VIII : LES ACTIONS NEUROTROPHIQUES SUIVANTES DE LA CP, - INDUCTION D'UNE AGRÉGATION CELLULAIRE ET STIMULATION DU CLIVAGE DE LA REELINE -, RÉPONDENT DIFFÉREMMENT À DES MODULATEURS DES VOIES SIGNALISATRICES AMPc/PKA ET ERK1/2**

Le travail de ce chapitre a été soumis à la revue *Neuroscience*, par Philippe Ducharme, Houda Salmi et Joanne Paquin (numéro de soumission : NSC-12-1411).

Ce chapitre aborde l'étude des mécanismes pouvant moduler les actions stimulatrices de la CP sur l'agrégation des neurones P19 et le clivage de la reeline. Les résultats montrent que les deux actions peuvent être indépendantes, la neuroagrégation étant sensible aux niveaux d'AMPc et d'activité de PKA et la génération de la reeline 300K dépendant d'une activation (phosphorylation) de ERK1/2.

Les expériences ont été réalisées par P. Ducharme ou par H. Salmi (étudiante à la maîtrise) sous la supervision de P. Ducharme. H. Salmi a fait les traitements suivants sur les neurones P19 : EPAC±CP (fig. 2) et ajouts précoce et tardif d'inhibiteurs de ERK (figs 6,7). Elle a effectué plusieurs immunobuvardages de la reeline et quantifié le degré d'agrégation des neurones sur plusieurs micrographies. Elle a aussi participé à la purification de la céruloplasmine. Le traitement des données, incluant l'analyse densitométrique des immunobuvardages de la reeline et l'évaluation statistique des résultats d'agrégation et de densitométrie, ont été faites par P. Ducharme. La planification expérimentale, la recherche bibliographique, le montage des figures et la rédaction du manuscrit ont été réalisés par P. Ducharme sous la supervision du Dre J. Paquin.



## 8.1 Résumé

La céruloplasmine (CP), une ferroxidase à cuivre extracellulaire retrouvée dans le foie, la circulation et le cerveau, est un régulateur majeur du métabolisme du fer. En plus de ce rôle, la CP pourrait participer dans l'organisation spatiale des neurones dans le cerveau en développement. En effet, lorsque des neurones nouvellement différenciés de cellules souches murines P19 sont traités avec de la CP, ils s'agrègent. De plus, ce traitement modifie le profil protéolytique de la reeline, une protéine extracellulaire reconnue pour son rôle essentiel dans le bon positionnement des neurones au cours du développement. Précisément, la CP stimule le clivage de la reeline en son fragment N-terminal de 300K. Les mécanismes de ces nouvelles actions neurotrophiques de la CP sont à peu près inconnus. L'AMPc et la protéine-kinase A (PKA) ainsi que les protéine-kinases ERK1/2 activées par des mitogènes ont des rôles cruciaux dans l'homéostasie, la morphologie et la motilité cellulaires. Ce travail vise à déterminer si ces médiateurs signalétiques peuvent réguler les actions de la CP sur les neurones P19. Les résultats montrent que l'AMPc inhibe l'action neuroagrégitrice de la CP alors qu'un inhibiteur de la PKA la reproduit. Aucune des deux molécules n'empêche le clivage de la reeline induit par la CP ni n'induit elle-même ce clivage. Ainsi, la neuroaggrégation induite par la CP, mais non le clivage de la reeline, peut être régulée par la signalisation de l'AMPc/PKA. La CP stimule rapidement la phosphorylation/activation d'ERK1/2 et cet effet n'est pas inhibé par l'AMPc. Des inhibiteurs pharmacologiques de la signalisation d'ERK1/2 n'ont pas affecté la neuroaggrégation mais ont partiellement diminué les niveaux de la reeline 300K générée par le traitement avec la CP. Ces résultats suggèrent une implication d'ERK1/2 dans l'action de la CP sur le profil de la reeline. Fait intéressant, la combinaison de l'AMPc avec les inhibiteurs de la signalisation d'ERK1/2 a pratiquement aboli la formation de la reeline 300K dans les cultures traitées avec la CP. En conclusion, l'AMPc/PKA et ERK1/2 modulent distinctement les actions de la CP sur l'organisation cellulaire et le profil de la reeline dans les cultures neuronales. De plus, ces actions de la CP peuvent se produire indépendamment l'une de l'autre mais le clivage de la reeline peut aussi être favorisé par la neuroaggrégation.

*Manuscrit*

**THE FOLLOWING NEUROTROPHIC ACTIONS OF CERULOPLASMIN,  
INDUCTION OF CELL AGGREGATION AND STIMULATION OF REELIN  
CLEAVAGE, RESPOND DIFFERENTLY TO MODULATORS OF  
cAMP/PKA AND ERK1/2 SIGNALINGS**

**Philippe Ducharme, Houda Salmi and Joanne Paquin\***

*Département de chimie et de biochimie and Centre BioMed, Université du Québec à  
Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec) H3C 3P8, Canada*

\*Address correspondence and reprint requests to : Dr. Joanne Paquin, Département de chimie et de biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec) H3C 3P8, Canada, Phone : (514) 987-3000, ext. 4990, Fax : (514) 987-4054, E-mail : [paquin.joanne@uqam.ca](mailto:paquin.joanne@uqam.ca)

**Footnotes**

**Abbreviations used:** Apro, aprotinin; CP, ceruloplasmin; 8-Br-cAMP, 8-bromo-cAMP; 8-Br-cGMP, 8-bromo-cGMP; db-cAMP, dibutyl-cAMP; 8-pCPT-Me-cAMP, 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyl-cAMP; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase-1/2; EPAC, exchange protein directly activated by cAMP; EPACa, EPAC activator; GPI, glycosylphosphatidylinositol; K, kDa; MAPK, mitogen-activated protein kinase;  $\alpha$ MEM, alpha-modified Eagle's minimal essential medium; PACAP, pituitary adenylyl cyclase-

activating polypeptide; phosphate buffer saline; PKA, protein kinase A; PKG, protein kinase G; Rp-cGMP, 8-bromo-Rp-isomer-cGMP; SBTI, soybean trypsin inhibitor; SDS, sodium dodecylsulfate

## 8.2 Abstract

Ceruloplasmin (CP), which is an extracellular copper ferroxidase found in liver, circulation and brain, is a main regulator of iron metabolism. Besides this role, CP could participate in the spatial organization of neurons in the developing brain. Indeed, when nascent neurons derived from mouse P19 stem cells are treated with CP, they aggregate together. Furthermore, this treatment modifies the proteolytic profile of reelin, an extracellular protein that is essential to the correct positioning of neurons during development. In fact, CP stimulates the cleavage of reelin into its N-terminal 300K fragment. The mechanisms of these novel neurotrophic actions of CP are almost unknown. cAMP/protein kinase A (PKA) as well as mitogen-activated protein kinase ERK1/2 have crucial roles in cell homeostasis, morphology and motility. This work determined whether these signaling mediators could regulate the actions of CP on P19 neurons. cAMP inhibited the neuroaggregative action of CP whereas an inhibitor of PKA reproduced it. Neither molecule affected CP-induced reelin cleavage nor stimulated reelin cleavage by itself. CP-induced neuroaggregation but not reelin cleavage can thus be regulated by cAMP/PKA signaling. CP rapidly stimulated ERK phosphorylation/activation in neurons and this effect was not abolished by cAMP. Inhibitors of ERK1/2 signaling did not affect neuroaggregation but they partly decreased the level of 300K reelin generated by CP treatment. These results point to an involvement of ERK1/2 in CP influence on reelin profile. Interestingly, combining cAMP to inhibitors of ERK1/2 signaling almost abolished the formation of 300K reelin in CP-treated cultures. In conclusion, cAMP/PKA and ERK1/2 distinctively modulate the actions of CP on cell organization and reelin profile in neuronal cultures. In addition, each CP action can occur independently of the other but reelin cleavage can also be favored by neuroaggregation.

**Key words :** Copper protein, embryonic carcinoma cells, neuronal differentiation, nervous system development, cAMP/cGMP, MAPK

### 8.3 Introduction

Brain development is orchestrated by a variety of molecules, the action of which is spatially and temporally regulated. One of the most studied of these molecules, reelin, is a 400 kDa (400K) glycoprotein of the extracellular matrix produced by specialized neurons during brain histogenesis (D'Arcangelo *et al.*, 1995 ; Scotti et Herrmann, 2002). Reelin is essential to the proper positioning of neurons through its influence on neuronal migration. The lack of functional reelin is associated with aberrant neuronal architecture (Tissir et Goffinet, 2003). The mechanisms by which reelin promotes proper neuronal positioning are not yet completely clear (Zhao et Frotscher, 2010). However, it is known that reelin binds to and activates either one or the other lipoprotein receptors, apolipoprotein E receptor-2 and very low density lipoprotein receptor, at the cell surface, and this results in the activation of intracellular protein adaptor disabled-1 (D'Arcangelo *et al.*, 1999 ; Hiesberger *et al.*, 1999 ; Howell, Herrick et Cooper, 1999 ; Trommsdorff *et al.*, 1999). In vivo, reelin exists under smaller forms produced by proteolysis, and two of these forms, 300K and 180K reelin, bear the native N-terminus (Jossin *et al.*, 2003). The identity of the protease(s) responsible of the generation of 300K and 180K reelin, the mechanisms regulating these proteolytic processes, and the specific role of each reelin form in brain are largely unknown (Jossin, Gui et Goffinet, 2007 ; Jossin *et al.*, 2004 ; Kohno *et al.*, 2009a ; Nakano *et al.*, 2007). Another protein, ceruloplasmin (CP), could also be involved in brain histogenesis in view of some of its actions on neurons, including its capacity to stimulate the cleavage of reelin into its 300K N-terminal fragment (Ducharme *et al.*, 2010).

CP is an 132K blue copper ferroxidase. It is secreted into the circulation by liver and is also synthesized in brain as a protein anchored to the surface of glial cells by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) group (Klomp et Gitlin, 1996 ; Patel et David, 1997). The secreted and GPI-modified CP originate from the same gene through alternative RNA splicing (Patel, Dunn et David, 2000 ; Yang *et al.*, 1990). CP is well established as a main regulator of iron metabolism in the organism (Harris *et al.*, 1995 ; Klomp et Gitlin, 1996 ; Texel, Xu et Harris, 2008). In humans and mice affected by a lack of functional CP, iron deposits accumulate in several organs, including brain, and cause their degeneration (Harris *et al.*, 1995 ; Patel *et al.*, 2002). CP is also recognized as an antioxidant molecule that



provides protection to cardiac cells and neurons in oxidative stress conditions (Aouffen *et al.*, 2001 ; Atanasiu *et al.*, 1996 ; Atanasiu *et al.*, 1998 ; Goldstein *et al.*, 1982 ; Jeong et David, 2006 ; Paradis *et al.*, 2010). As mentioned above, CP could additionally have a developmental role in brain, as suggested by two sets experiments done *ex vivo*. First, blocking the function of endogenous CP with an anti-CP antibody inhibited the migration of neurons in postnatal rat cerebellar microexplant cultures (Mittal et David, 1994b ; Patel et David, 1997). Second, our studies done on neurons derived from mouse P19 embryonic carcinoma cells, an appropriate model of nascent cerebral neurons, showed that exogenously-brought CP induced neuron aggregation and stimulated generation of 300K reelin (Ducharme *et al.*, 2010 ; Maltais *et al.*, 2003). Time course analysis and the use of function-blocking anti-reelin antibody indicated that neuroaggregation preceded the detection of reelin cleavage and did not depend on reelin action (Ducharme *et al.*, 2010). Those results led us to propose two models relating the two actions of CP on P19 neurons (Fig. 8.1). Depending on the model, the cleavage of reelin into 300K fragment is a consequence of neuroaggregation or an independent parallel event that is completed after neuroaggregation.

Mechanisms of the two neurotrophic actions of CP are not resolved. However, either one or both actions would involve the binding of CP to receptor/acceptor sites on neurons (Maltais *et al.*, 2003). In addition, a serine protease, acting extracellularly, is implicated in neuroaggregation and perhaps also in the generation of 300K reelin (Ducharme *et al.*, 2010). The objective of the present work were to determine whether induction of neuroaggregation and stimulation of the generation of 300K reelin are independent CP actions, and to identify intracellular signaling molecules of these actions. Since nothing was known on CP signaling in general or on the mechanisms responsible for the generation of 300K reelin, we looked for proteins having actions that could resemble those of CP in order to orient our efforts. For example, pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide that has neuroprotective activity and influences the migration of cerebellar neurons during development (Botia *et al.*, 2007). Most of the neurotrophic effects of PACAP are mediated through cAMP that connects in sequence to protein kinase A (PKA) and extracellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2), or to exchange factor directly activated by cAMP (EPAC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 (Botia *et al.*, 2007). In general,

cAMP/PKA and ERK1/2 are recognized as having crucial roles in cell homeostasis, morphology and migration (Amato et Man, 2011 ; Howe, 2004) (Huang, Jacobson et Schaller, 2004 ; Pullikuth et Catling, 2007). In addition, there exist numerous examples of cross-talks between cAMP/PKA and members of MAPK family such as ERK1/2 and p38 (Gerits *et al.*, 2008 ; Kostenko *et al.*, 2011).

In this work, we used pharmacological agents to investigate possible effects of cAMP/PKA and ERK1/2 signalings in the actions of CP on P19 neurons. The results revealed that CP-induced neuroaggregation and generation of 300K reelin respond to modulation of these signalings. In addition, they improved our comprehension of the relationship that exists between both CP actions.

## **8.4 Experimental procedures**

### **8.4.1 CP preparation**

CP was purified from bovine plasma by fractionated precipitation with ammonium sulfate followed by a single chromatographic step on aminoethyl-agarose (Ducharme *et al.*, 2010 ; Maltais *et al.*, 2003 ; Mateescu *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1994). CP preparations were pure as confirmed by  $A_{610nm}/A_{280nm}$  values greater than 0.04 and homogeneous electrophoretic protein profiles.

### **8.4.2 Cell culture, differentiation and treatment**

P19 cells were cultured and differentiated as described (Ducharme *et al.*, 2010 ; Maltais *et al.*, 2003). Undifferentiated cells were routinely passaged every two days with trypsin. To induce neuronal differentiation, cells were seeded, on day zero (D0), in bacteriological-grade culture dishes and grown as floating spheroids, during 4 days, in differentiation medium consisting of alpha-modified Eagle's minimal essential medium ( $\alpha$ MEM; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% serum (5% heat-inactivated foetal bovine serum and 5% bovine serum; PAA Laboratories, Rexdale, ON, Canada) and 0.5  $\mu$ M retinoic acid (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). This medium was replenished on D2. On D4, spheroids were dissociated in the presence of trypsin, the action of which was stopped by

adding  $\alpha$ MEM containing 10% serum. Dissociated cells (neurons) were carefully washed with phosphate buffer saline (PBS), seeded in gelatinized tissue culture dishes and cultured in serum-free maturation medium (Neurobasal medium containing 2% v/v B27 supplement [Invitrogen] and 0.5 mM L-glutamine). Agents added in the maturation medium were at the final concentration indicated in parentheses : CP (0.5 mg/mL); 8-bromo-adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cAMP; 1 mM), 8-bromo-guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cGMP; 1 mM) and 8-bromo-Rp-isomer-guanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate (Rp-cGMP; 50  $\mu$ M) (Calbiochem, San Diego, CA, USA); dibutyryl-adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (db-cAMP; 1 mM), N-[2-(p-bromo-cinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H89; 10  $\mu$ M), 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-pCPT-Me-cAMP; 100  $\mu$ M) and soybean trypsin inhibitor (SBTI; 100  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich); aprotinin (Apro; 30  $\mu$ g/mL) (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada); 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (PD98059; 10  $\mu$ M) and 2,3-bis[amino[(2-aminophenyl) thio]methylene]-butanedinitrile (U0126; 1  $\mu$ M) (Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada). Unless otherwise indicated, agents were added in culture media at cell seeding on D4 and remained until D6 (48 h total). At the end of treatments, cell cultures were photographed to evaluate neuronal aggregation. Culture media were collected, complemented with protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich) and centrifuged to remove any cellular debris. Cells were subjected to total protein extraction. Clarified culture media and cell extracts were stored at -20°C until analysis by Western blotting.

#### 8.4.3 Evaluation of neuronal aggregation

The size of the culture surface occupied by cells was used to evaluate aggregation. Photographs of cultures were taken at 100X magnification using a Nikon Eclipse Ti microscope (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada), equipped with a Nikon Digital Sight (DS)-U2 camera and controlled by NIS-Elements Advanced Research 3.0 software. Pictures were developed to 16.5 cm x 22 cm and placed under a transparent grid made of 638 squares of 56 mm<sup>2</sup> each. Squares occupied by cells were counted (aggregation decreased the number of occupied squares). This analysis was done blindly with respect to cell treatments. Results were expressed as percentages of surface occupancy compared to the control condition (set at 100%). The value for each dish was the average of a minimum of three pictures. For time

lapse video microscopy, newly seeded D4 neurons were cultured in a stage top incubator (INU-ONICS-F1 model; Tokai Hit, Shizuoka, Japan) under conditions of temperature, CO<sub>2</sub> and humidity stabilized by a INU-F1 control unit (Tokai Hit). Control neurons and neurons treated with CP were monitored over 48 h at a frequency of 1 picture/10 min. The video editing was done using Adobe Premier Pro v7.0 software (Adobe Systems Canada, Ottawa, Ontario, Canada) (Annexe A).

#### 8.4.5 Western blotting

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis procedures were as described in Ducharme *et al.* (2010) with few modifications. Briefly, protein samples (cell extracts, 20 µg; culture media, 20 µL) were loaded onto polyacrylamide gels (12.5% for ERK1/2 and cofilin; 6% for reelin). Gels were run for 15 min at 100 V followed by 1 h at 150 V (ERK1/2 and cofilin) or for 35 min at 75 V followed by 1 h at 150 V (reelin) using a MiniProtean TetraCell apparatus (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were then electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes for 35 min (2 h for reelin), using a Trans-blot SD system (Bio-Rad). Membranes were blocked, before immunoblotting, with 5% (w/v) BSA (ERK1/2 and cofilin) or 3% (w/v) non-fat dry milk (reelin) in Tris buffer saline containing 0.1% Tween-20. Primary antibodies were used in the following dilutions: rabbit anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), 1/1 000; rabbit anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; Cell Signaling Technology), 1/1000; mouse anti-reelin G10 (Calbiochem), 1/1 000; mouse anti-β-actin (Sigma-Aldrich), 1/100 000. Secondary antibodies, conjugated to horseradish peroxidase, were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Immune complexes were revealed with Immobilon Western Chemiluminescent Substrate (Millipore, Nepean, ON, Canada) and exposed to HyBlot CL films (Denville Scientific Inc., Toronto, ON, Canada). Films were digitally scanned using a Canon PIXMA MP480 scanner. Densitometric analysis was done using Image J 1.43u analysis software (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

#### 8.4.6 Statistics

Results were expressed as means  $\pm$  SEM of at least three independent cell cultures. Statistical analysis was done using Student's *t* test and the JMP IN 4.0.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and  $p < 0.05$  was used as the significance value.

### 8.5 Results

#### 8.5.1 CP-induced neuroaggregation, but not reelin processing, is inhibited by activation of cAMP/PKA signalings

The P19 murine embryonic carcinoma cell line provides an useful model to study early aspects of nervous system development. P19 cells indeed resemble the pluripotent stem cells of the embryo and efficiently differentiate into neurons and glial cells when induced with retinoic acid (McBurney, 1993). Neurons appear first and can thus be studied independently of glial cells. In our culture conditions, neurons represent about 95% of the cells in differentiated D4 to D10 cultures (Poirier *et al.*, 2006). P19 neurons form mixed populations of cells that mature into functional neurons in culture and are representative of neurons of the central nervous system (Cadet et Paquin, 2000 ; Finley, Kulkarni et Huettnner, 1996 ; Jeannotte *et al.*, 1997 ; MacPherson *et al.*, 1997 ; McBurney, 1993 ; Parnas et Linial, 1997a ; Yao, Bain et Gottlieb, 1995).

As previously reported (Ducharme *et al.*, 2010 ; Maltais *et al.*, 2003), when nascent P19 neurons (D4 neurons) were incubated with CP during 48 h, they associated into aggregates (Fig. 8.2A; compare CP and Control). Aggregated neurons occupied a much smaller portion of the culture surface compare to well spread control neurons (Fig. 8.2B). In addition to neuroaggregation, CP stimulated the generation of 300K reelin in P19 neuron cultures, which otherwise produced 400K and 180K reelin (Figs 8.2C,D). To determine whether cAMP/PKA pathway could be involved in these neuronal actions of CP, we first treated P19 neurons with H89, an inhibitor of PKA (Gerits *et al.*, 2008). H89 was added in the culture medium of newly seeded D4 neurons, in the presence and absence of CP, and its effects were evaluated 48 h later. H89 did not abolished CP-induced neuroaggregation (Figs 8.2A,B; compare CP and CP+H89), nor CP-stimulated generation of 300K reelin (Figs 8.2C,D). However, in



absence of CP, H89 induced neuroaggregation on its own although it did not stimulate generation of 300K reelin (Fig. 8.2; compare Control and H89). These findings suggested that the neuroaggregative action of CP, but not its effect on reelin, could be modulated by cAMP/PKA signaling. In accordance with this suggestion, CP-induced neuroaggregation, but not reelin cleavage, was inhibited by the treatment of neuronal cultures with 8-Br-cAMP or db-cAMP, which are cell permeant analogs of cAMP and activators of PKA (Fig. 8.2; compare CP+cAMP and CP). In this series of experiments and throughout this work, results obtained by using 8-Br-cAMP or db-cAMP were similar and, for this reason, were pooled together and reported under the label cAMP in figures. In absence of CP, these cAMP analogs allowed the spreading of cells on culture surfaces contrary to PKA inhibitor H89 (Figs 8.2A,B; compare Control, cAMP and H89).

The anti-aggregative effect of cAMP was specific to this nucleotide since it was not observed with 8-Br-cGMP, an activator of protein kinase G (PKG) (see cGMP and CP+cGMP in Figs 8.2A,B). In addition, Rp-cGMP, an inhibitor of PKG (Wei *et al.*, 1998), did not induce neuroaggregation in contrast to PKA inhibitor H89 (Figs 2A,B). Like modulators of cAMP/PKA however, modulators of cGMP/PKG had no effect on reelin profiles in control and CP treatments (Figs 8.2C,D). Because cAMP can activate EPAC in addition to PKA, we studied the reaction of P19 neurons to the presence of 8-pCPT-Me-cAMP, an EPAC activator (EPACa) (Gerits *et al.*, 2008). EPACa did not inhibit CP-induced neuroaggregation, indicating that PKA and not EPAC mediated the inhibitory effect of cAMP on this action of CP (Figs 2A,B; compare EPACa+CP and EPACa). EPACa had no effect on the reelin profile of control and CP-treated cultures (Figs 8.2C,D). Finally, we investigated whether neuroaggregation induced by PKA inhibitor H89 could duplicate that induced by CP. This was indeed the case since, like for CP (Ducharme *et al.*, 2010), the aggregative action of H89 was inhibited by SBTI and Apro, which are inhibitors of extracellularly acting serine proteases (Fig. 8.3).

Overall, activation of cAMP/PKA pathway, but not of cAMP/EPAC or cGMP/PKG pathways, cancels the neuroaggregative action of CP. In addition, results of cell treatment with CP+cAMP show that, in the presence of CP, reelin cleavage can occur even though

neuroaggregation is inhibited. This finding reveals the independence of the two neurotrophic actions of CP and thus favors model B over model A depicted in Fig. 8.1.

### **8.5.2 Generation of 300K reelin requires longer exposure to CP than does neuroaggregation**

We next determined whether neuroaggregation and reelin cleavage have the same requirement with respect to the duration of CP treatment. We compared, over 48 h, the behavior of control neurons and CP-treated neurons by time lapse video imaging. Difference in culture morphology began to be observable at 8 h (Fig. 8.4A). At that time, cells had not yet extensively aggregated in cultures treated with CP but exhibited a rounded appearance that contrasted with the flatten morphology of control neurons. We thus chose the time 8 h post-seeding to interrupt or not the treatment of neurons with CP, considering that this time coincided with the start of neuroaggregation process. Three interventions were done at 8 h of CP treatment : replacement of medium containing CP by control medium (CP//to Control), replacement of medium containing CP with medium containing cAMP (CP//to cAMP), and addition of cAMP in the medium containing CP (CP//+cAMP) (Fig. 8.4B). Cultures were pursued until 48 h and then examined for morphology and reelin profile. Neuroaggregation completely developed even if CP was removed at 8 h (Figs 8.4C,D; CP//to control). This indicated that an 8 h-treatment with CP was sufficiently long to firmly engage neuroaggregation. In contrast, removal of CP at 8 h compromised the generation of 300K reelin (Figs 8.4E,F). Interestingly, the introduction of cAMP at 8 h, whether or not CP was conserved in the culture medium, reversed the neuroaggregative action of CP even if this action was well engaged (Figs 8.4C,D; CP//+cAMP and CP//to cAMP). Not surprisingly, the late addition of cAMP to CP did not inhibit reelin cleavage (Fig. 8.4E,F; CP//+cAMP). Like in the CP//to control condition, the generation of 300K reelin was greatly reduced by the early removal of CP in the CP//to cAMP condition (Figs 8.4E,F). Thus, the sustained presence of CP is important to generate 300K reelin.

### **8.5.3 CP rapidly stimulates ERK1/2 phosphorylation, an action that is not abolished by cAMP**

To evaluate a possible involvement of ERK1/2 signaling in neuronal actions of CP, we first analyzed ERK1/2 phosphorylation during CP treatment. Time course profiles of ERK1/2 phosphorylation in control and CP-treated cultures are shown in Fig. 8.5A. CP treatment rapidly, within 20 min, stimulated ERK1/2 phosphorylation. Levels of phospho-ERK1/2 then gradually decreased to reach control values at 2 h. Considering the inhibitory influence of cAMP on CP-induced neuroaggregation, we expected to observe an inhibition, by cAMP, of the stimulatory action of CP on ERK1/2 phosphorylation. Contrarily, the phosphorylation profile of ERK1/2 in the CP+cAMP condition was statistically not different from that of CP alone (Fig. 8.5B). In any case, cAMP would have increased, rather than decreased, the level or the duration of ERK1/2 phosphorylation. Thus, ERK1/2 could be not important for the neuroaggregative action of CP but, perhaps, for reelin cleavage.

### **8.5.4 Inhibition of ERK1/2 signaling affects CP-stimulated generation of 300K reelin, an effect amplified by cAMP**

To determine whether the early stimulation of ERK1/2 phosphorylation by CP has a role in the neuronal actions of CP, we treated neurons with PD98059 and U0126, two pharmacological agents that indirectly prevent ERK1/2 signaling. These agents indeed inhibit the activity of MEK1/2, which are kinases that phosphorylate/activate ERK1/2 (Davies et al., 2000). When PD98059 or U0126 was added at the same time than CP in neuronal cultures, there was no inhibition of the stimulatory action of CP on the generation of 300K reelin (Figs 8.6C,D; PD+CP and U+CP). We also added these agents 1 h before CP to ensure more efficient inhibition of MEK1/2 at the time of CP introduction, considering the rapidity with which CP stimulated ERK1/2 phosphorylation. Under these conditions, PD98059 and U0126 decreased the generation of 300K reelin by about 2 fold (Figs 8.6C,D; PD/+CP and U/+CP). These data point to the involvement of ERK1/2 in the action of CP on reelin profile. The presence of cAMP during these treatments amplified, by 2-4 fold, the inhibitory action of PD98059 and U0126 on reelin processing (Figs 8.6C,D; PD/+CP+cAMP versus PD/+CP, and U/+CP+cAMP versus U/+CP). This amplification was unexpected given that cAMP had no

effect on this phenomenon. PD98059 and U0126 had no influence on neuroaggregation. Indeed, they neither blocked the neuroaggregative action of CP, nor the anti-neuroaggregative action of cAMP (Figs 8.6A,B).

Considering that CP should be present in neuron cultures for more than 8 h to stimulate the generation of 300K reelin and that inhibition of ERK1/2 signaling at the beginning of CP treatment affected this reelin processing, we determined whether inhibition of ERK1/2 signaling at 8 h of CP treatment would have an influence. Like in early addition, delayed addition of PD98059 and U0126 had no influence on neuroaggregation : it neither affected the neuroaggregative effect of CP nor the anti-neuroaggregative effect of cAMP (Figs 8.7A,B). However, in contrast to early addition (i.e. 1 h before CP treatment), delayed addition of PD98059 and U0126 had no significant effect on CP-induced reelin processing (Figs 7C,D; CP//+PD and CP//+U). This finding underlines the importance of the early activation of ERK1/2 signaling by CP in reelin processing. Interestingly, when either ERK1/2 inhibitor was combined with cAMP in the conditions of delayed addition, the level of 300K reelin importantly dropped by 8 fold compare to CP alone (Figs 8.7C,D; CP//+PD+cAMP and CP//+U+cAMP). Notice that late addition of cAMP has reversed the neuroaggregative action of CP (Figs 8.7A,B). These results would indicate that maintenance of neuroaggregation can contribute to some extent to reelin processing.

Finally, neurons treated with CP received both an early provision and a late provision of ERK1/2 inhibitor. In these cases, there was almost no production of 300K reelin although neuroaggregation still happened (Fig. 8.7; PD/+CP//+PD and U/+CP//+U).

## 8.6 Discussion

Our previous work showed that CP induces aggregation of nascent neurons such as those derived from P19 embryonic stem cells (Maltais *et al.*, 2003). In addition to neuroaggregation, CP stimulates reelin cleavage into 300K N-terminal fragment (Ducharme *et al.*, 2010). These findings raise the possible implication of CP in nervous system development, perhaps in events related to or surrounding neuronal migration considering the crucial role of reelin in this process. This belief is also shared by David's group whose study

revealed a positive influence of endogenous CP in the migration of neurons along glial cells in cerebellar microexplants (Mittal et David, 1994b ; Patel et David, 1997). The exact role that CP could have in neuronal migration through stimulation of reelin cleavage is elusive at the moment since the function of each reelin fragment in nervous system development is still not completely resolved. The present work revealed that the trophic actions of CP on P19 neurons, namely cell aggregation and reelin cleavage, are independent of each other and respond differently to modulation of cAMP/PKA and ERK1/2 signalings.

Little is known on the mechanisms of CP actions in neuronal contacts and reelin processing. However, either one or both actions of CP on P19 neurons could involve receptor/acceptor sites for CP since CP bound to these cells (Maltais *et al.*, 2003). An immunocytochemical analysis by Mollgard et al. also raised a possible association of CP with neurons in the developing human brain (Mollgard *et al.*, 1988). In the same line of thought, it was observed that GPI-CP naturally expressed on Schwann cells concentrates at sites of contact with neurons in cocultures of both cell types (Salzer *et al.*, 1998). Besides receptor/acceptor sites, a serine protease, acting extracellularly, is involved in the neuroaggregative action of CP and perhaps also in its stimulatory action on reelin processing (Ducharme *et al.*, 2010). Clues of possible intracellular signaling interveners in the neurotrophic actions of CP are rare since little is known on CP signaling in general. Exceptionally, it was reported that intraperitoneal administration of CP somehow normalized cAMP and cGMP levels in irradiated and tumor-bearing mice (Antonenko, Berdinskikh et Chebotarev, 1984 ; Antonenko *et al.*, 1985 ; Antonenko, Sanina et Chebotarev, 1986). We decided to investigate a possible influence of cAMP/PKA and ERK1/2 signalings since both signalings are implicated in multiple aspects of brain development and function, including neuronal proliferation, migration, morphogenesis and synaptic communication (Amato et Man, 2011 ; Botia *et al.*, 2007 ; Haase et Bicker, 2003). In addition, there are important cross-talks, positive as well as negative, between these signalings in a variety of cellular situations (Kostenko et al., 2011). EPAC signaling, which like PKA signaling depends upon cAMP, has been implicated in neuronal differentiation, neuritogenesis and cell adhesion/migration. EPAC has also the ability to extend the duration of PKA-dependent ERK1/2 activation (Borland, Smith et Yarwood, 2009). With the use of pharmacological agents that target



cAMP, PKA, EPAC and ERK1/2 signalings, this work showed that cAMP/PKA and ERK1/2 distinctively influence the two neurotrophic actions of CP. Model B rather than model A (Fig. 8.1) thus best describes the relationship between the induction of neuroaggregation and the stimulation of reelin cleavage by CP. We propose an ameliorated model B that incorporates new findings concerning cAMP/PKA and ERK1/2 (Fig. 8.8).

Activating cAMP/PKA signaling affected CP-induced neuroaggregation but not reelin cleavage. This experiment has been instrumental in demonstrating the independence of these two actions of CP since, according to model A (Fig. 8.1), there was this possibility that neuroaggregation was essential to reelin cleavage. Interestingly, inhibiting cAMP/PKA signaling with the use of H89 reproduced the neuroaggregative action of CP and even the sensitivity of this action to serine protease inhibitors SBTI and Apro, implicating an extracellular serine protease activity in neuroaggregation triggered by H89. The collection of results concerning cAMP/PKA suggests that CP-induced aggregation could involve a shutdown of cAMP/PKA pathway. Alternatively, cAMP/PKA could be not directly involved in aggregation but, once activated, could counteract this process. In vivo, in the complex organization of brain, there could exist mechanisms based on cAMP/PKA to regulate CP function. There are examples of an influence of cAMP signaling on neuronal migration. Stimulation of this signaling was shown to inhibit migration of postmitotic neurons in insect enteric nervous system (Haase et Bicker, 2003). PACAP, a neuropeptide which elevates cAMP levels upon binding to its receptors, reduces motility of mouse cerebellar granule neurons (Cameron *et al.*, 2007 ; Cameron *et al.*, 2009). The migration of human cerebellar granule neurons that had been slowed down by treatment with methylmercury could be restored by Rp-cAMP, an inhibitor of cAMP/PKA cascade (Fahrion *et al.*, 2012). This last result underlines the plastic, reversible nature of neuronal migration, a characteristic that is shared by neuroaggregation induced by CP in the P19 cell model. Indeed, late addition of cAMP reversed this effect of CP. cAMP has also an influence in other aspects of neuronal development. For instance, it sustains the functional maturation of neurons during neuritogenesis, axon initiation and neuronal polarization (Amato et Man, 2011 ; Bogoch et Linial, 2008). As mentioned above, the neuroaggregative action of CP implicates the participation of an extracellular serine protease. There could exist a link between such

protease and cAMP signaling in CP action as it exists in other situations. As an example, the action of serine protease thrombin, which is an agonist of platelet activation/aggregation, passes through a diminution of intracellular cAMP concentration (Zhang et Colman, 2007). In astrocyte cultures, elevation of cAMP upregulates the expression of tissue plasminogen activator (Lee *et al.*, 2008) and spinesin (Yamaguchi *et al.*, 2008).

CP rapidly increased the level of phospho-ERK1/2 in contact with P19 neurons. However, inhibition of ERK1/2 signaling in the presence of CP reduced the level of 300K reelin but did not inhibit neuroaggregation although neuroaggregation precedes apparition of 300K reelin. Unexpectedly, cAMP, which did not inhibit by itself the generation of 300K reelin by CP, amplified the inhibitory action of ERK1/2 inhibitors on reelin cleavage. To reconcile these astonishing results, we propose that reelin cleavage can occur through two paths, a path that involves ERK1/2 activity and is independent of neuroaggregation (Fig. 8.8, path 2) and a path that goes through neuroaggregation, a phenomenon which is sensitive to cAMP level (path 1). Reelin cleavage mainly occurs through path 2 and is not affected if path 1 is blocked by cAMP. However, if path 2 is blocked by early inhibition of ERK1/2 signaling, reelin cleavage can occur to a certain extent through path 1, as long as CP is present in the extracellular milieu. Only when both paths are blocked can we see strong inhibition of reelin cleavage. How can neuroaggregation favor reelin cleavage when path 2 is blocked? Plausibly, neuron aggregation can create locally, within aggregates, high concentrations of a molecule important for reelin cleavage, a molecule that could be a protease. Independently of neuroaggregation, this protease (or another one) can become expressed at high levels or activated as a result of CP treatment. Whether the same protease is involved in reelin cleavage within the two paths is yet to be determined. However, the fact that ERK1/2 is involved in reelin cleavage through path 1 (as revealed by late addition of ERKi) as well as through path 2 (as revealed by early addition of ERKi) would agree with the implication of the same protease.

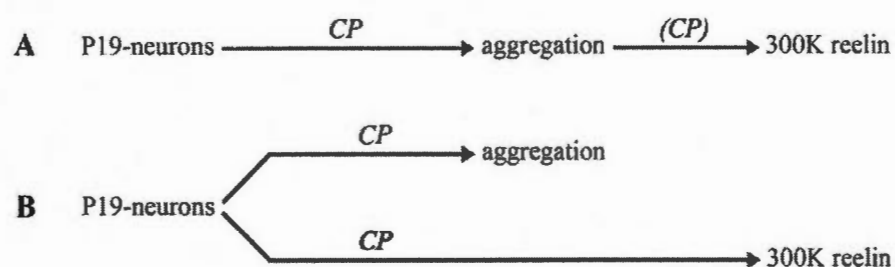
In conclusion, the two trophic actions of CP on nascent neurons, which are induction of cell aggregation and stimulation of the generation of 300K reelin, occur independently of each other. However, 300K reelin can also be produced through neuroaggregation.

Neuroaggregation is sensitive to cAMP level and PKA activity while the generation of 300K reelin depends on an early activation of ERK1/2. The identification of cellular targets of cAMP/PKA and ERK1/2 requires further investigation. They could be transcription factors but also components or regulators of the cytoskeleton. P19 neurons provide a useful system to study the neuronal actions of CP independently of the presence of glial cells and possibly to better understand some aspects of reelin processing and function.

## **8.7 Acknowledgments**

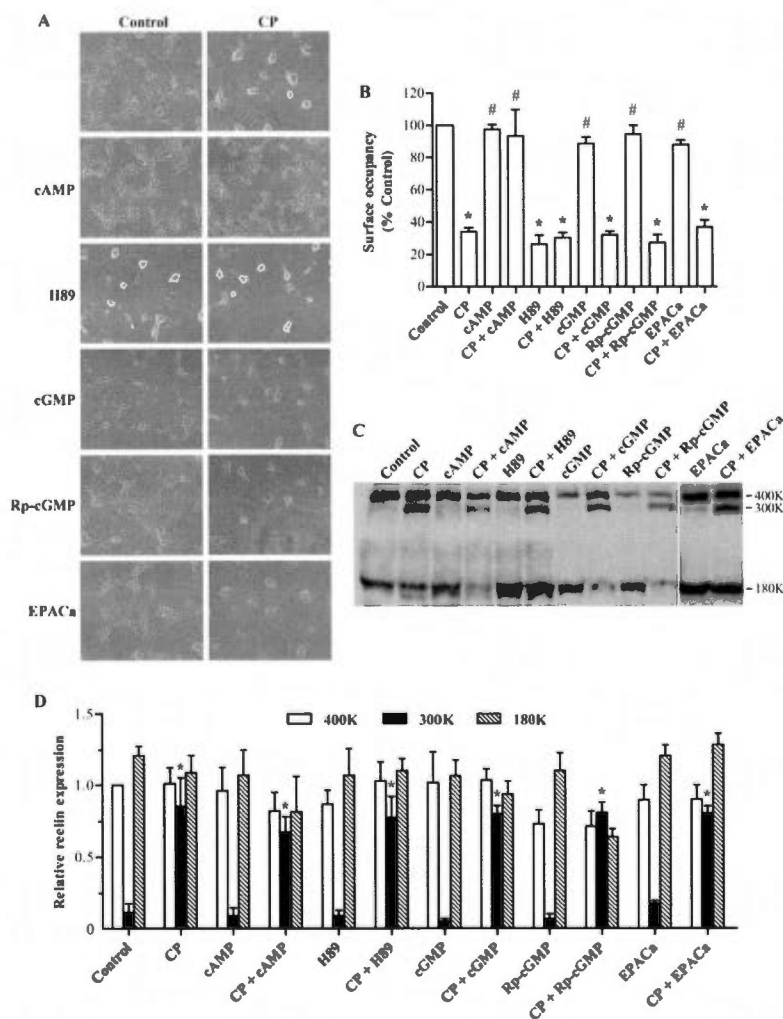
This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Studentships afforded to P.D. (Centre BioMed and FARE Program, UQAM) and H.S. (FARE Program, UQAM) are acknowledged. We also acknowledge the contribution of Nathalie St-Pierre who, as an undergraduate student, did some preliminary experiments related to this project. The authors have no conflict of interest.

## 8.8 Figures

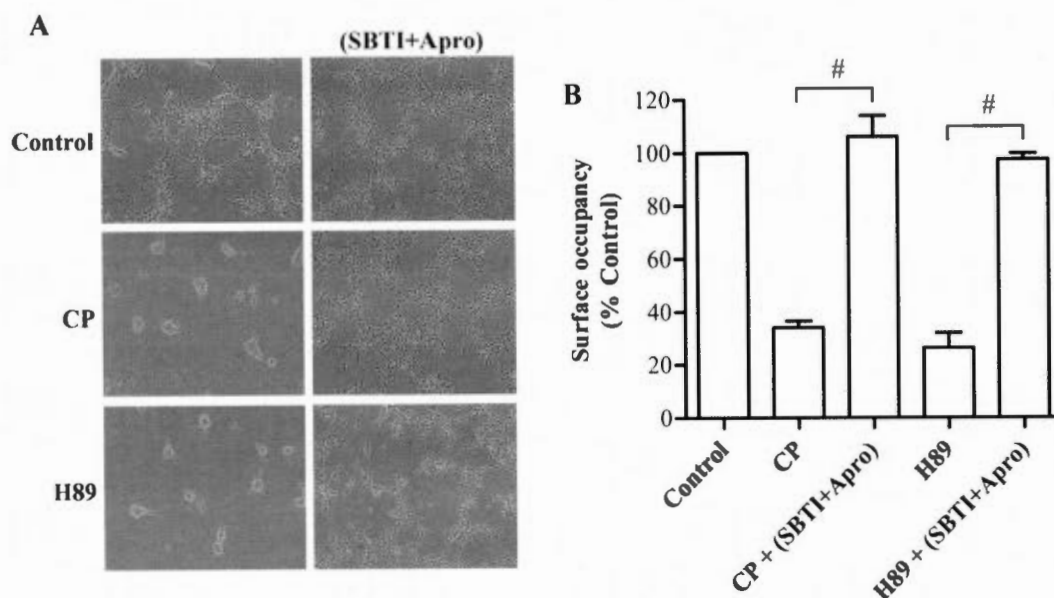


**Figure 8.1 Possible relationships between CP-induced neuroaggregation and reelin cleavage.** Day Models A and B have been previously proposed to relate the induction of neuronal aggregation and the stimulation of reelin cleavage by CP (Ducharme *et al.*, 2010). In model A, aggregation of neurons is a prerequisite to reelin cleavage. In this model, CP triggers aggregation but not necessarily reelin cleavage. In model B, reelin cleavage is independent of aggregation even if it is detected later, and CP triggers each process. Une version électronique est fournie (CD).

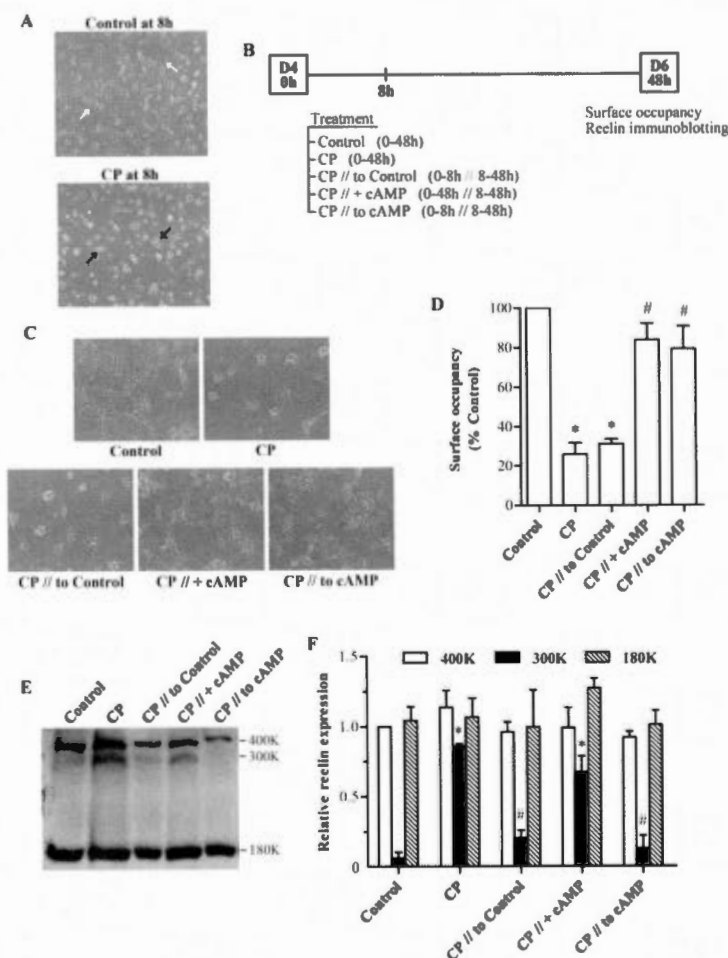




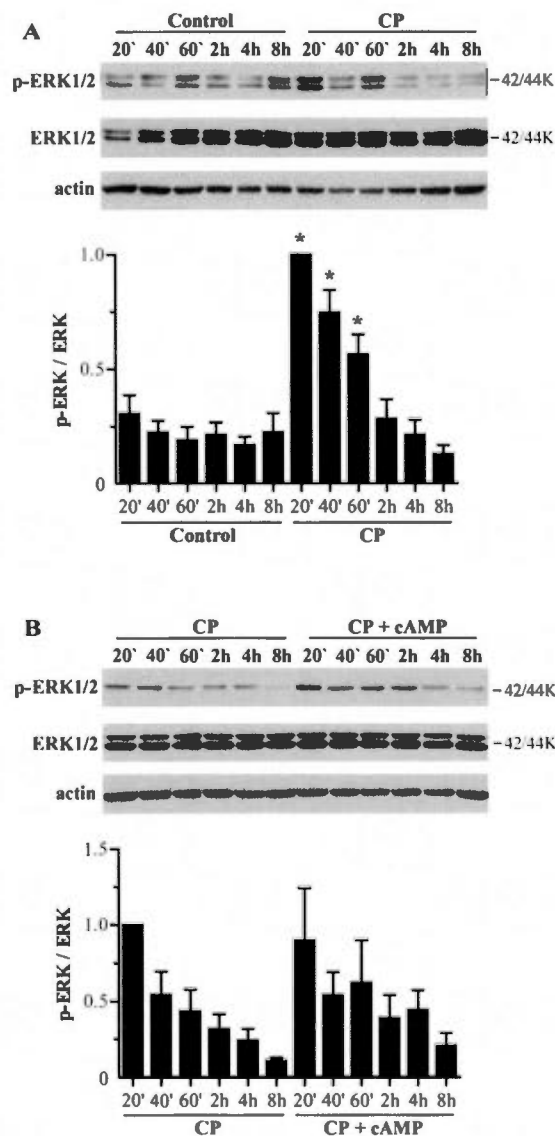
**Figure 8.2 The neuroaggregative action of CP is inhibited by activation of cAMP/PKA signaling.** D4 P19 neurons were seeded in maturation medium and incubated for 48 h in absence (Control) or presence of CP (0.5 mg/mL), PKA activator 8-Br-cAMP or db-cAMP (referred to as cAMP; 1 mM), PKA inhibitor H89 (10  $\mu$ M), PKG activator 8-Br-cGMP (referred to as cGMP; 1 mM), PKG inhibitor Rp-cGMP (50  $\mu$ M) and EPACa 8-pCPT-Me-cAMP (100  $\mu$ M). (A) Photographs (100X) of cell cultures at 48 h and (B) measurements of culture surfaces occupied by cells. Results are expressed as percentages of Control and reported as the means  $\pm$  SEM of at least three independent studies. (C) Representative immunoblots of reelin from culture media and (D) densitometric analysis of different reelin immunoblots. Results are expressed relatively to 400K reelin of Control and reported as the means  $\pm$  SEM of at least three independent studies. With respect to surface occupancy and to 300K reelin level, the symbol \* indicates a significant difference with Control and the symbol #, a significant difference with CP ( $p < 0.05$ ). Notice that there was no significant difference in 300K reelin between CP and CP+cAMP treatments. Une version électronique est fournie (CD).



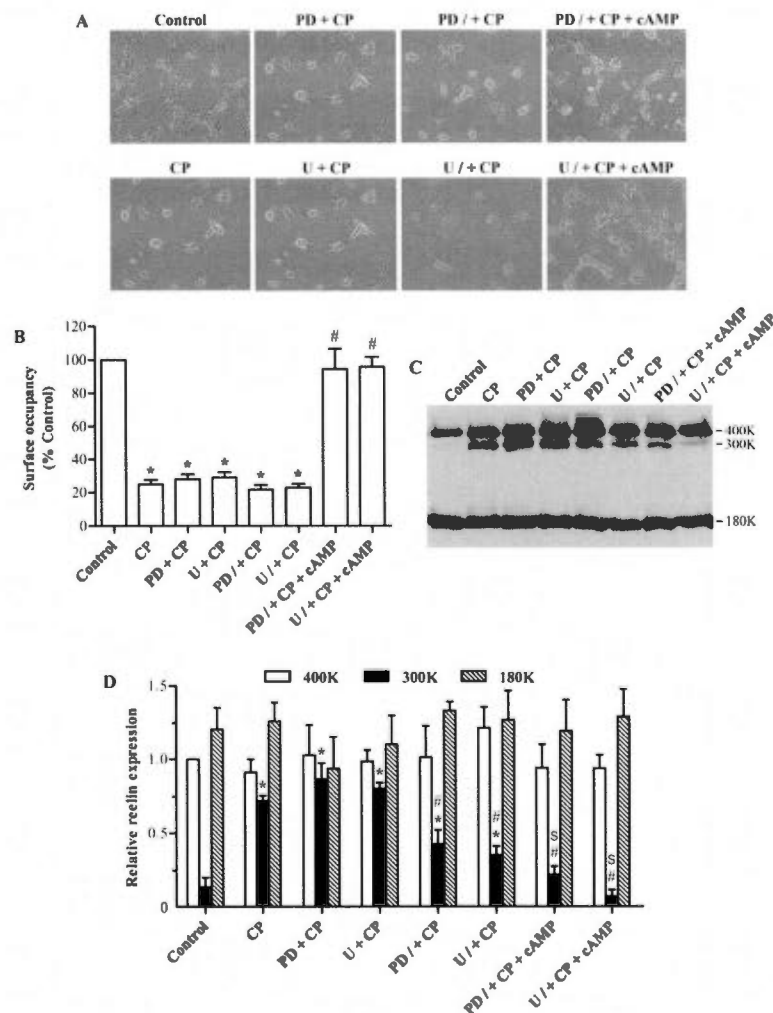
**Figure 8.3 PKA inhibitor H89 duplicates the neuroaggregative action of CP.** D4 neurons were incubated for 48h without (Control) or with CP, H89 and the protease inhibitors SBTI and Apro (respectively, 100 and 30  $\mu\text{g/mL}$ ). **(A)** Photographs (100X) of cell cultures at 48 h. Notice that morphologies of Control cultures and cultures treated with SBTI+Apro are similar. **(B)** Measurements of culture surfaces occupied by cells. Results are expressed as percentages of Control and reported as the means  $\pm$  SEM of three independent studies. The symbol # indicates a significant anti-aggregative effect of SBTI and Apro in CP and H89 treatments ( $p < 0.05$ ). Une version électronique est fournie (CD).



**Figure 8.4 Removal of CP after 8 h compromises the generation of 300K reelin but not neuroaggregation.** (A) D4 neurons were cultured without (Control) or with CP and monitored by video over 48 h. Morphological difference between both cultures began to be detectable at 8 h as shown by comparing pictures extracted from videos at that time : CP-treated neurons exhibited a rounded morphology (black arrows) whereas control neurons had a well spread appearance (white arrows). Videos are provided as supplemental material (Annexe 1). (B) Summary of neuron treatments that implicated an intervention at 8 h post-seeding (see section 8.4.2 for more information). (C) Photographs (100X) of neuron cultures at 48 h and (D) measurements of culture surfaces occupied by cells. Results are expressed as percentages of Control and reported as the means  $\pm$  SEM of three independent studies. (E) A representative immunoblot of reelin at 48 h and (F) densitometric analysis of different reelin immunoblots. Results are expressed relatively to 400K reelin of corresponding Control and reported as the means  $\pm$  SEM of three independent studies. With respect to surface occupancy and to 300K reelin level, the symbol \* indicates a significant difference with Control and the symbol #, a significant difference with CP ( $p < 0.05$ ). Une version électronique est fournie (CD).

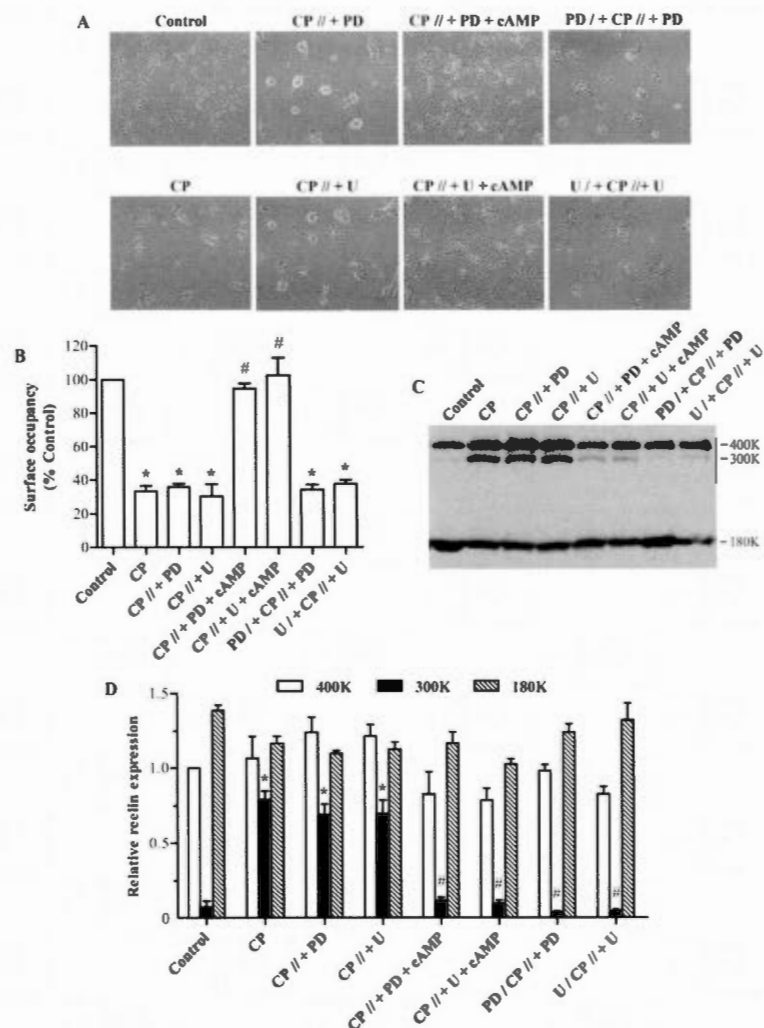


**Figure 8.5 Time course of ERK1/2 phosphorylation during treatment of neurons with CP and cAMP.** The extent of ERK1/2 phosphorylation was compared for (A) Control neurons versus neurons treated with CP, and (B) neurons treated with CP versus neurons treated with CP+cAMP. Neurons were collected at the indicated times over the first 8 h of treatment. Immunoblot specimens show signals of phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) and total ERK1/2 as well as of actin, which was used to verify similarity of protein loads. Densitograms (means  $\pm$  SEM) are for three to six independent studies. p-ERK1/2 is expressed relatively to total ERK1/2 and normalized to corresponding CP sample at 20 min. The symbol \* indicates a significant difference between CP and Control of the same time in A, whereas there was no significant difference within CP and CP+cAMP pairs in B ( $p < 0.05$ ). Une version électronique est fournie (CD).

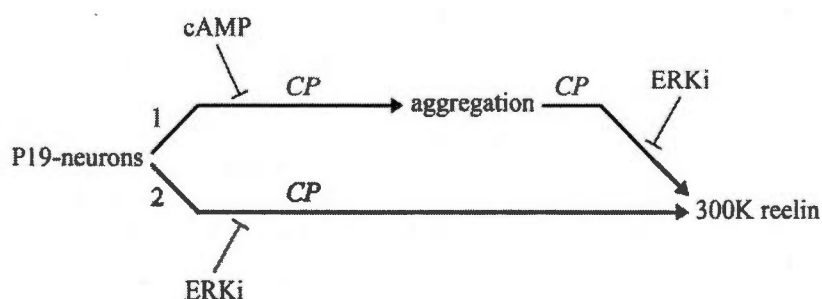


**Figure 8.6 Neuronal effects of the early addition of inhibitors of ERK1/2 signalings.** D4 neurons were incubated for 48 h without (Control) or with CP or CP+cAMP. The inhibitors PD98059 (PD; 10  $\mu$ M) and U0126 (U; 1  $\mu$ M) were added at the same time than CP (PD+CP and U+CP), 1 h before CP (PD/+CP or U/+CP) or 1 h before CP+cAMP (PD/+CP+cAMP or U/+CP+cAMP). (A) Photographs (100X) of cell cultures at 48 h and (B) measurements of culture surfaces occupied by cells. Results are expressed as percentages of Control and reported as the means  $\pm$  SEM of three to five independent studies. (C) A representative immunoblot of reelin and (D) densitometric analysis of different reelin immunoblots. Results are expressed relatively to 400K reelin of Control and reported as the means  $\pm$  SEM of three to five independent studies. With respect to surface occupancy and to 300K reelin level, the symbol \* indicates a significant difference with Control, the symbol #, a significant difference with CP, and the symbol S, a significant difference with corresponding treatment lacking cAMP ( $p < 0.05$ ). It is worth mentioning that cultures treated with PD, U, PD/+cAMP and U/+cAMP behaved similarly to Control cultures, showing no neuroaggregation and practically no 300K reelin (not shown). Une version électronique est fournie (CD).





**Figure 8.7 Neuronal effects of the late addition of inhibitors of ERK1/2 signalings.** D4 neurons were incubated for 48 h without (Control) or with CP. In some cultures, PD98059 (PD) and U0126 (U) were added 8 h after CP, either alone (CP//+PD or CP//+U) or in combination with cAMP (CP//+PD+cAMP or CP//+U+cAMP). Other cultures received twice PD or U inhibitor, that is 1 h before CP and 8 h after CP (PD/+CP//+PD or U/+CP//+U). (A) Photographs (100X) of cell cultures at 48 h and (B) measurements of culture surfaces occupied by cells. Results are expressed as percentages of Control and reported as the means  $\pm$  SEM of three independent studies. (C) A representative immunoblot of reelin and (D) densitometric analysis of different reelin immunoblots. Results are expressed relatively to 400K reelin of Control and reported as the means  $\pm$  SEM of three independent studies. With respect to surface occupancy and to 300K reelin level, the symbol \* indicates a significant difference with Control and the symbol #, a significant difference with CP ( $p < 0.05$ ). Une version électronique est fournie (CD).



**Figure 8.8** A new model relates the neurotrophic actions of CP and their modulation by cAMP and ERK1/2 signalings. A revisited model B (Fig. 8.1) is proposed to explain relationship that exists between CP-induced neuroaggregation and generation of 300K reelin. Reelin cleavage into 300K fragment can happen independently of neuronal aggregation through path 2, which is inhibited by inhibitor of ERK1/2 signaling (ERKi). Reelin cleavage can also occurs as a result of cell aggregation through path 1, as long as CP remains present in neuronal cultures. Early blocking of either path 1 (aggregation) by cAMP or path 2 by ERKi permits reelin cleavage through the unblocked path. Blocking both paths prevents the generation of 300K reelin, in addition to inhibiting aggregation. Une version électronique est fournie (CD).

**PARTIE III**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE**

## CHAPITRE IX : DISCUSSION

### 9.1 Généralités

Le développement du cerveau à partir des cellules souches embryonnaires est un processus hautement organisé. Il est ponctué de plusieurs étapes critiques telles la neurulation, la spécification neuronale des cellules souches du neuroectoderme afin de générer les neuroblastes puis ultimement les neurones, la corticogénèse permettant aux grandes structures du cerveau de voir le jour, la synaptogénèse et finalement la maturation des neurones afin que ceux-ci soient parfaitement opérationnels. Les mécanismes moléculaires qui contrôlent ces différentes étapes font appel à plusieurs molécules dont des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion cellulaire et de guidage ainsi que des composantes de la matrice extracellulaire. Ces mécanismes sont à la base du développement normal et, ultimement, du bon fonctionnement du système nerveux. Des défauts dans l'une ou l'autre de ces étapes cruciales du développement neuronal seraient à l'origine de nombreuses maladies neurodéveloppementales (Gleeson, 2001). Pour mieux comprendre les causes de certains désordres neurologiques en lien avec le développement du cerveau, il apparaît impératif d'approfondir notre compréhension du développement de cet organe. Dans ce contexte, l'utilisation du modèle cellulaire P19, un modèle de cellules souches embryonnaires capables de se différencier en neurones ressemblant à ceux du SNC, offre un moyen pertinent de contribuer à mieux comprendre le développement neuronal et ultimement, celui du cerveau.

Depuis près de 15 ans, l'équipe du Dre Joanne Paquin, en collaboration avec le groupe du Dr Mircea-Alexandru Mateescu, étudie les propriétés d'une protéine multifonctionnelle, la CP. La CP est synthétisée et sécrétée par le foie mais des chercheurs ont mis en évidence l'existence d'une CP, pourvue d'une ancre GPI, produite et exprimée à la surface des astrocytes dans le cerveau (Klomp et Gitlin, 1996 ; Patel et David, 1997). Depuis, il a été bien établi qu'elle joue, de par son activité ferroxidasique, un rôle essentiel dans le métabolisme

du fer dans le cerveau (Qian et Ke, 2001 ; Xu *et al.*, 2004). Les travaux récents publiés par les équipes des Drs Paquin et Mateescu ont permis de montrer que la CP induit l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires P19 (Maltais *et al.*, 2003). Considérant cette action de la CP sur des neurones P19 ainsi que son expression dans le cerveau, nous avons émis l'hypothèse que la CP pourrait avoir un rôle dans le développement du cerveau. La présente thèse apporte des éléments *ex vivo* et *in vivo* qui appuient l'hypothèse d'un rôle de la CP dans le développement du système nerveux. Les résultats obtenus donnent aussi quelques informations concernant le mécanisme des actions neuronales de la CP *ex vivo*. L'ensemble des travaux souligne la pertinence de mieux définir le rôle développemental de la CP dans des études futures et identifie le modèle cellulaire P19 comme outil intéressant pour évaluer certains aspects des mécanismes de ce rôle.

Les travaux de cette thèse ont débuté à partir de l'observation d'une action agrégative de la CP sur des neurones P19 et visaient à trouver une signification biologique à ce phénomène ainsi qu'à identifier les mécanismes moléculaires de cette action. Dans l'optique de mieux orienter nos efforts, nous avons considéré les différentes étapes du développement neuronal afin d'identifier l'étape à laquelle pourrait le mieux s'apparenter l'action neuroagrégative. La migration neuronale est l'étape qui a retenu notre attention. Toutefois, nous n'écartons pas la possibilité que la CP agisse à d'autres étapes du développement neuronal.

Les travaux de cette thèse ont été présentés sous forme de trois articles originaux. Le premier article montre que l'action neuroagrégative de la CP implique une activité protéolytique extracellulaire et est de plus accompagnée d'un effet sur le profil d'expression de la reeline, une protéine clé dans la régulation de la neuromigration (Tissir et Goffinet, 2003). Nous démontrons pour la première fois la production de la protéine reeline par les neurones P19. Seule une étude avait rapporté l'expression du gène de la reeline dans les cultures de neurones P19 (Bogoch et Linial, 2008). Les neurones P19 nouvellement différenciés expriment les formes de 400K et 180K de la reeline. Le traitement des neurones avec la CP stimule la formation de la reeline 300K. Ce résultat suggère une intervention régulée de la génération des fragments de la reeline dans le développement neuronal. Le deuxième article portant sur les résultats *in vivo* chez la souris montre que la CP apparaît dans

le cerveau en développement avant ou en même temps que la reeline. Les trois formes portant la terminaison-N de la reeline (400K, 300K et 180K) apparaissent rapidement durant la période embryonnaire chez les souris de type sauvage. Cependant, la forme de 300K est bien moins abondante chez les souris  $CP^{-/-}$ . Ce résultat est tout à fait en ligne avec ceux obtenus avec les neurones P19 : il y a ainsi une corrélation entre la présence de la CP et les niveaux protéiques de la reeline 300K. Les souris  $CP^{-/-}$  ont aussi de plus faibles taux de p-cofiline, une cible distale de la reeline et qui est impliquée dans plusieurs aspects du développement du système nerveux, incluant la migration des neurones. Finalement, nous montrons dans le troisième article que les deux actions trophiques de la CP sur les neurones P19 naissants, soient l'induction de la neuroaggrégation et la génération de la reeline 300K, peuvent se produire indépendamment l'une de l'autre. La neuroaggrégation est sensible aux niveaux d'AMPC et d'activité de PKA alors que la génération de la reeline 300K dépend d'une activation précoce d'ERK1/2.

## 9.2 Implication d'une activité protéolytique dans les actions neuronales de la CP

Les travaux de Maltais *et al.* (2003) ont rapporté que la CP induit l'aggrégation des neurones P19. En nous inspirant des connaissances concernant la neuromigration pour évaluer les mécanismes d'action de la CP, nous avons porté notre attention sur la reeline et les protéases à sérine pour les raisons suivantes : 1) la reeline est un acteur principal dans la neuromigration développementale (Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001 ; Tissir et Goffinet, 2003), 2) la reeline serait une protéase à sérine qui régulerait la composition de la MEC et conséquemment la migration cellulaire (Quattrocchi *et al.*, 2002), et 3) bon nombre de protéases à sérine sont exprimées dans le cerveau et sont notamment impliquées dans le développement et la maintenance de cet organe, de même que dans certaines pathologies du système nerveux (Almonte et Sweatt, 2011). Nous avons donc pour objectif de déterminer s'il existe, dans la lignée cellulaire P19, des relations entre l'action neuroaggrégative de la CP et la reeline, ou d'autres protéases à sérine extracellulaires.

Les résultats rapportés dans le premier article (chapitre VI, publié dans la revue *Neuroscience*) montrent deux éléments essentiels. Premièrement, une voie métabolique impliquant une protéase à sérine agissant extracellulairement est impliquée dans le



phénomène de neuroagrégation. En effet, lorsque les neurones P19 sont incubés en présence de la CP, ils forment des agrégats dans un délai de 24-48 h et ce phénomène est inhibé par l'ajout simultané de SBTI et d'aprotinine (SBTI/Apro) (fig. 6.1). Deuxièmement, les neurones P19 expriment la reeline sous forme 400K et 180K et l'ajout de la CP dans leur milieu de culture induit la production de la forme 300K, un phénomène aussi inhibé par les inhibiteurs SBTI/Apro (fig. 6.3).

Ces résultats à priori ne permettaient pas encore de conclure que la génération de la reeline 300K pouvait dépendre d'une protéase à sérine. En effet, si la neuroagrégation se révélait essentielle au clivage de la reeline (fig. 6.6A), d'autres types de protéases pourraient fort bien être impliquées dans ce clivage. Par contre, parce que les résultats du 3<sup>e</sup> manuscrit ont établi l'indépendance des deux actions neurotrophiques de la CP (figs. 6.6B et 8.8), nous pouvons à présent avancer qu'une protéase à sérine est impliquée dans la génération de la reeline 300K. Nous ne savons pas encore si cette protéase est aussi celle qui est impliquée dans la neuroagrégation puisque le SBTI et l'aprotinine agissent sur plusieurs protéases. Dans les deux cas, le domaine catalytique de la protéase est extracellulaire (protéase sécrétée ou ectoprotéase membranaire) puisque les inhibiteurs SBTI et aprotinine ne pénètrent pas dans les cellules. De plus, dans le cas de la reeline, les neurones P19 ne contiennent pas la forme 300K (fig. 6.3).

Des résultats préliminaires suggèrent que la protéase responsable de la formation de la reeline 300K pourrait être une protéine diffusant librement dans le milieu (Annexe C). En effet, lorsque le milieu neuroconditionné provenant de neurones non-traités (contrôle) est prélevé au J6, centrifugé pour éliminer les cellules flottantes, puis réincubé en présence de CP durant 24-48 h, il y a génération de la reeline 300K dans ce milieu. Ce résultat suggère que la synthèse et la sécrétion de la protéase responsable de la production de la reeline 300K par les neurones ne dépend pas de la CP mais que l'action de la protéase sur la reeline nécessite la présence de la CP dans le milieu neuroconditionné.

Considérant qu'il existe plus d'une centaine de protéases à sérine identifiées à ce jour, la tâche d'identifier le(s) protéase(s) à sérine impliquée(s) dans les actions neuronales de la CP

peut s'avérer difficile. Des travaux exploratoires ont évalué l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et l'*urokinase-type plasminogen activator* (uPA) comme protéases candidates.

Il est connu que le tPA, une protéase à sérine sécrétée et exprimée dans le cerveau, est un modulateur de la migration neuronale (Ho-Tin-Noe *et al.*, 2009 ; Seeds, Basham et Haffke, 1999 ; Tsirka, 2002). Le tPA peut être inhibé par l'aprotinine mais rien n'est rapporté pour le SBTI. Nous avons donc vérifié si ce candidat pouvait être impliqué au moyen d'un inhibiteur pharmacologique spécifique du tPA, l'acide epsilon-aminocaproïque (EACA) (Hatzia Apostolou, Katsoris et Papadimitriou, 2003). L'ajout de l'EACA en présence de la CP sur les neurones P19 n'a empêché ni la neuroaggrégation de se produire ni la génération du 300K, écartant ainsi la possibilité que le tPA et la plasmine (la forme active du plasminogène suite à son clivage par le tPA) soient impliqués. L'uPA est une protéase à sérine sécrétée et distribuée dans le cerveau qui, tout comme le tPA, peut cliver et activer le plasminogène en plasmine et a des implications dans le neurodéveloppement et la migration cellulaire (Crippa, 2007 ; Del Bigio, Hosain et Altumbabic, 1999). Le plus important inhibiteur physiologique de l'uPA est la serpine-1, aussi appelée inhibiteur du plasminogène activateur-1 (PAI-1). Ce dernier peut aussi bien inhiber le uPA que le tPA (Van De Craen, Declercq et Gils, 2012) Or, l'ajout de cet inhibiteur en présence de la CP sur les neurones P19 n'a empêché ni la neuroaggrégation, ni la production du 300K reeline. Nous n'avons pas cependant testé différentes concentrations du PAI-1.

D'autres protéases candidates potentielles peuvent être envisagées. La thrombine est une protéase à sérine impliquée dans le développement du SNC (Yoshida et Shiosaka, 1999). À première vue, elle semble peu intéressante puisqu'elle n'est pas inhibée par le SBTI et l'aprotinine. Cependant, elle pourrait être impliquée dans l'activation d'autres protéases à sérine sensibles à ces inhibiteurs. L'utilisation d'inhibiteurs de la thrombine tels la protéase-nexine-1 (PN-1) ou encore l'antithrombine III (Almonte et Sweatt, 2011) pourrait permettre de vérifier son implication dans les actions neuronales de la CP.

La neurotrypsine est une protéase à sérine spécifique au cerveau mais est surtout connue pour son implication dans le remodelage des connexions synaptiques, particulièrement au niveau du développement tardif du cerveau de même que dans le cerveau adulte (Molinari *et al.*, 2003). Il n'existe pas encore d'inhibiteur spécifique de la neurotrypsine mais l'utilisation d'ARN interférant pourrait être envisagée pour vérifier l'implication de cette protéase dans les actions neuronales de la CP. La neuropsine, une protéase de la famille des kallikréines, fortement exprimée dans l'hippocampe et l'amygdale, aurait un rôle dans la plasticité synaptique et l'induction de PLT, des processus qui surviennent plus tardivement au cours du développement du cerveau. Néanmoins, il existe un inhibiteur de la neuropsine, l'inhibiteur de protéase à sérine-3, qui pourrait être utilisé pour confirmer ou infirmer l'implication de cette protéase dans la neuroagrégation induite par la CP et la production de la reeline 300K (Almonte et Sweatt, 2011).

Nous avons constamment gardé en tête la possibilité que les préparations de CP plasmatique puissent contenir des traces d'une protéase sanguine qui causerait la neuroagrégation et le clivage de la reeline. Mais les observations s'accumulent en faveur de l'implication d'une protéase neuronale. Les préparations de CP passées sur SBTI-agarose conservent encore la capacité d'induire la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K. Cela va dans la bonne direction mais n'est pas une preuve irréfutable puisqu'il pourrait y avoir une protéase latente qui pourrait être activée au contact des neurones. Outre la préparation de CP, le H89 (fig. 8.2) induit aussi la neuroagrégation et qui plus est, son effet est sensible aux inhibiteurs SBTI + aprotinine. Enfin, notons que l'absence de CP endogène chez les souris  $CP^{-/-}$  va de pair avec une diminution des niveaux de reeline 300K (chapitre VII), ce qui milite en faveur d'une protéase neuronale ou tissulaire dans au moins cette action de la CP.

Un autre aspect qui demeure à être évalué au chapitre des protéases est l'identité du ou des substrats de la protéase impliquée dans la neuroagrégation. Une première cible envisagée était la CP elle-même. Or, ce n'est pas le cas. Le profil protéique de la CP ne change pas dans les milieux neuroconditionnés additionnés de CP, avec ou sans les inhibiteurs SBTI/Apro (fig. 6.2). Des cibles potentielles pourraient être des protéines de la MEC telles la

fibronectine, la laminine ou le collagène (Lukasiuk, Wilczynski et Kaczmarek, 2011). À cet égard, une étude *in vitro* a rapporté que la reeline agirait comme protéase à sérine qui peut dégrader ces composantes de la matrice (Quattrocchi *et al.*, 2002). Ainsi, une possibilité peut être que des modifications sur le profil protéique de la reeline, comme par exemple la génération de la forme 300K sous l'influence de la CP, puisse avoir un impact sur l'action protéolytique de la reeline. Notons cependant que le rôle de protéase de la reeline demeure controversé. Toutefois, il demeure pertinent d'analyser les composantes de la MEC mentionnées ci-dessus par immunobuvardage, afin de vérifier s'il y a fragmentation/dégradation de ces composantes lorsque les neurones sont mis en présence de CP et en second lieu, si l'ajout des inhibiteurs SBTI/Apro l'en empêche.

Les protéines qui sont responsables des interactions cellule-cellule et cellule-MEC sont d'autres cibles potentielles des protéases. Parmi ces protéines, on compte notamment les cadhérines et les intégrines. Le profil d'expression de la cadhérine a été analysé par immunobuvardage à partir de lysats totaux de neurones P19 traités et non-traités à la CP et n'a pas révélé de différences significatives entre ces deux conditions. Toutefois, il est à noter que puisque l'analyse a été faite à partir de lysats totaux, il ne reflète pas nécessairement le niveau d'expression des cadhérines retrouvées exclusivement à la surface cellulaire. Ce niveau d'expression en surface peut donc différer en présence ou non de CP. Dans cette optique, un marquage préalable des protéines de surface cellulaire à la biotine pourrait être envisagé. Suivant la lyse cellulaire, les protéines biotinylées peuvent être isolées du lysat total par complexation à la streptavidine couplée à des billes d'agarose pour permettre la précipitation du complexe. Les protéines membranaires biotinylées peuvent ensuite être analysées par immunobuvardage pour l'expression de la cadhérine. Cette méthodologie peut également s'avérer pertinente pour l'analyse de l'expression membranaire des intégrines. À cet égard, l'analyse de l'intégrine- $\alpha 3\beta 1$  peut s'avérer un choix intéressant puisqu'elle est reconnue pour son implication dans l'adhésion et la migration neuronale et pour son interaction avec la reeline (Fatemi, 2005b ; Sanada, Gupta et Tsai, 2004).

Des récepteurs membranaires peuvent constituer d'autres substrats potentiels des protéases. Il existe des exemples d'une telle situation. C'est notamment le cas des récepteurs

PAR1-4, des récepteurs couplés à des protéines G et qui peuvent être activés par clivage protéolytique au niveau de leur domaine extracellulaire et ce, par différentes protéases à sérine. Ces récepteurs sont impliqués dans divers aspect du développement du SNC (Almonte et Sweatt, 2011). D'autre part, plusieurs études ont soulevé l'existence de récepteurs de la CP et ce, dans différents organes (voir tableaux 1.1 et 1.2). Plus récemment, les travaux de Maltais et al (2003) ont montré que la CP peut se lier spécifiquement aux neurones P19, suggérant l'existence d'un récepteur neuronal de la CP. Considérant que l'action neuroagréative de la CP fait intervenir une activité protéolytique, il peut être envisagé que celle-ci agisse sur un tel récepteur de la CP. À ce propos, une étude portant sur le récepteur érythrocytaire de la CP suggère que le clivage de ce récepteur serait nécessaire pour la liaison avec la CP (Puchkova *et al.*, 1990). Les études menées sur le récepteur fibroblastique de la CP suggèrent également l'implication d'une action protéolytique sur ce récepteur pour permettre son interaction avec la CP. Qui plus est, il est rapporté que la dégradation protéolytique de ce récepteur puisse être inhibée par des inhibiteurs de protéases à sérine (Sasina, Puchkova et Gaitskhoki, 1998).

Nous venons d'élaborer sur l'activité protéolytique impliquée dans la neuroagrégation. Abordons à présent les aspects protéolytiques reliés au clivage de la reeline. Soulignons d'entrée de jeu que peu est connu sur les protéases responsables de ces clivages.

L'utilisation du GM6001, un inhibiteur général de métalloprotéases, a montré l'implication d'une métalloprotéase dans le clivage de la reeline. En effet, l'équipe de Jossin *et al.* (2007) a montré que l'ajout de cet inhibiteur sur des tranches de tissus corticaux prélevés à E13 entraîne une désorganisation des couches neuronales, semblable à celle qui prévaut dans le phénotype *reeler*. Plus encore, il est montré que le GM6001 empêche la formation de la reeline 180K. Les auteurs concluent que le clivage de la reeline au site N-t (responsable de la génération du 180K) dépend d'une métalloprotéase sécrétée par les neurones et que ce blocage de la protéolyse de la reeline serait en cause dans la perturbation de l'organisation des couches neuronales (Jossin, Gui et Goffinet, 2007). Cette étude suggère donc que le clivage protéolytique de la reeline est important dans l'organisation neuronale. Nous avons vérifié l'effet de cet inhibiteur sur les neurones P19 en présence de CP (annexe

B). L'ajout du GM6001 avec la CP sur les neurones au J4 empêche la formation du 180K tel que rapporté par l'équipe de Jossin. D'autre part, le GM6001 semble également avoir un impact sur la génération de la reeline 300K en diminuant son expression.

Jossin *et al.* (2007) proposent que les clivages en N-t et C-t surviennent de manière indépendante. Nos résultats (Annexe D) pourraient cependant apporter une nuance : il se pourrait que les clivages de la reeline se produisent de manière séquentielle, la formation de la reeline 180K précédant celle de la 300K. Des observations soutiennent cette idée. Premièrement, les résultats obtenus avec les neurones P19 (chapitre 6) montrent que l'accumulation de la reeline 180K précède la génération du 300K et non l'inverse (fig. 6.3). Le même ordre d'apparition s'observe également au cours du développement du cerveau chez la souris (fig. 7.3). D'autre part, des résultats présentés dans l'annexe D montrent que lorsque le milieu de neurones P19 traités avec le GM6001 (milieu contenant seulement la reeline 400K et pas de 180K) a été récolté au jour 6 puis réincubé à nouveau en absence de neurones mais additionné de la CP, pour une période de 24 à 48 h, aucune génération de reeline 300K n'est observé (Annexe D). Dans ce dernier cas, une autre interprétation serait qu'une suite de deux protéases (métalloprotéase et protéase à sérine) soit nécessaire à la formation de la reeline 300K.

D'autres études ont rapporté que la génération de la reeline 180K est issue d'un clivage protéolytique de la reeline une fois endocytosée dans la cellule. Précisément, suivant la liaison de la reeline à son récepteur membranaire, le complexe reeline-récepteur est endocytosé dans la cellule. Dans l'endosome, la métalloprotéase cliverait la reeline au site N-t et le fragment de 180K nouvellement généré retourné dans le milieu extracellulaire. Le mécanisme de relargage de la reeline 180K est sous la gouvernance de Rab11, une protéine de la famille des petites protéines-G couplées au GTP et qui régule le transport vésiculaire entre différents compartiments sous-cellulaires de même que le recyclage endosomal vers la membrane plasmique (Hibi et Hattori, 2009). Les auteurs de l'étude suggèrent que le fragment de 180K pourrait être important dans la régulation de d'autres composantes de la MEC. Ainsi, en lien avec les résultats portant sur l'effet du GM6001 sur le clivage de la reeline dans le modèle P19, il pourrait être envisageable que ce fragment de 180K relargué



dans le milieu extracellulaire puisse agir de manière directe ou indirecte, et de concert avec la CP, dans la génération de la reeline 300K. Le fragment de 180K pourrait être impliqué dans une séquence d'évènements menant à l'activation ou encore le recrutement de la seconde protéase impliquée dans le clivage de la reeline au site C-t.

Voici quelques suggestions d'expérimentation pour évaluer le caractère séquentiel des clivages de la reeline sur les neurones en présence de la CP. Il pourrait être envisagé de tester l'effet de la Bafilomycine A (Baf A). Le Baf A est un inhibiteur qui empêche le recyclage endosomal vers la membrane sans pour autant perturber l'endocytose. Il a été montré que l'addition de Baf A sur les cellules HEK293T qui expriment ApoER2 recombinant, permet l'endocytose de la reeline native mais diminue considérablement le relargage de la reeline 180K dans le milieu extracellulaire (Hibi et Hattori, 2009). Ainsi, il pourrait être évalué si le blocage de la sécrétion du 180K dans la MEC perturbe la production de la reeline 300K. Une autre stratégie pourrait être de transfecter les neurones P19 avec un mutant de Rab11 (Rab11S25 N). Cette forme mutée de Rab11 interfère dans le transport endosomal et le relargage de la reeline 180K dans le milieu extracellulaire (Hibi et Hattori, 2009). Notons que ces deux approches expérimentales ont été testées dans un modèle cellulaire non-neuronal (la lignée HEK293T provient de cellules humaines embryonnaires de rein) et qu'elles pourraient être appliquées aux neurones pour vérifier la similitude des résultats. D'autre part, le blocage partiel ou complet des transports vésiculaires sous-cellulaires ou encore vers la membrane plasmique peut engendrer d'autres réponses cellulaires qui n'ont rien à voir avec la sécrétion de la reeline 180K, ce qui ultimement pourraient biaiser l'interprétation des résultats.

Des interrogations demeurent à propos d'une possible activité de protéase à sérine de la reeline. Des chercheurs ont soulevé l'hypothèse que la reeline agit sur la migration neuronale, au cours de la corticogénèse, via son activité de protéase à sérine (Maurin *et al.*, 2004). Toutefois, soulignons que d'autres chercheurs remettent en question le fait que la reeline soit une protéase à sérine (Kohn et Hattori, 2010).

### 9.3 Relation entre la CP et la reeline

L'élément essentiel qui découle des résultats présentés dans les chapitres VI et VII est qu'une relation existe entre la CP et la reeline *ex vivo* comme *in vivo* dans le cerveau en développement. En effet, la présence de CP va de pair avec les niveaux plus élevés de reeline 300K. Notons que c'est à la suite des résultats obtenus avec les neurones P19 que nous avons adressé la question des formes de la reeline durant le développement du cerveau, un aspect qui n'avait pas été couvert jusqu'à présent. Il s'agit ici de la première fois qu'une telle possibilité de relation entre la CP et la reeline est évoquée. Jusqu'à présent, les profils protéiques tant de la CP que de la reeline et de ses fragments, ont été peu documentés dans le développement du cerveau chez la souris. Les résultats du deuxième article montrent dans un premier temps que la CP apparaît dans le cerveau en développement avant ou en même temps que la reeline (figs 7.2 et 7.3). Les trois formes N-t de la reeline (400K, 300K et 180K) apparaissent rapidement durant la période embryonnaire chez les souris de type sauvage. Cependant, le point majeur des résultats réside dans le fait que la forme 300K de la reeline est bien moins abondante chez les souris *CP<sup>-/-</sup>* durant la période embryonnaire. Ce résultat s'avère capital puisqu'il corrobore des résultats obtenus *ex vivo* à partir des neurones P19 et justifie la pertinence d'étudier plus en profondeur cette relation physiologique entre la CP et la reeline.

#### 9.3.1 Aspects histologiques

Considérant que la reeline est un facteur important dans l'organisation des couches neuronales du cerveau en développement (Tissir et Goffinet, 2003) et que nos résultats montrent que la CP influe sur le profil protéique de la reeline, il serait pertinent d'analyser par (immuno) histochimie l'organisation structurale du cerveau des souris *CP<sup>-/-</sup>*, une analyse encore non faite jusqu'à ce jour. Des similitudes dans la lamination du cerveau pourraient exister entre ces souris et les souris *reeler*. Il est intéressant de noter que des études comportementales effectuées chez ces deux types de souris révèlent certaines ressemblances, en particulier des déficits de coordination motrice (Frotscher, 1998 ; Patel *et al.*, 2002). J'ai moi-même observé de façon qualitative et non quantitative que ces souris semblent éprouver des troubles de coordination motrice, particulièrement au niveau des pattes inférieures.

Les études histologiques du cerveau des souris  $CP^{-/-}$  pourraient être faites durant la période embryonnaire parce que c'est durant cette période que le profil protéique de la reeline diffère chez les souris  $CP^{-/-}$  comparativement aux souris de type sauvage (figs 7.3 et 7.4). On ne doit pas s'attendre nécessairement à des similitudes exactes au niveau de l'organisation des neurones entre les deux souches de souris puisque les souris déficientes en CP expriment la reeline 400K et 180K (de même que la forme 300K mais seulement après la naissance), alors que les souris *reeler* n'expriment pas de reeline. Ainsi, les défauts d'organisation neuronale chez les souris  $CP^{-/-}$  pourraient être subtils. D'autre part, il n'est pas exclu que des mécanismes compensatoires puissent être impliqués chez les souris  $CP^{-/-}$  pour éviter ou minimiser l'émergence de ces défauts d'organisation laminaire. Chez les souris *reeler*, les défauts de lamination sont permanents et peuvent donc être observés aussi bien au moment où les couches neuronales se forment durant le stade embryonnaire, qu'après la naissance et au cours de l'âge adulte (Frotscher, 1998). Dans l'éventualité où des mécanismes compensatoires existeraient chez les souris  $CP^{-/-}$ , l'analyse histologique des couches neuronales à partir de cerveaux postnataux et adultes pourraient ne pas permettre de mettre en évidence les conséquences d'une déficience en CP sur l'organisation architecturale des neurones, d'où l'intérêt dans un premier temps de procéder à l'étude histologique des cerveaux embryonnaires. Enfin, il se pourrait aussi que la CP n'ait pas d'impact visible sur le positionnement des neurones mais qu'elle puisse être impliquée dans d'autres étapes du neurodéveloppement comme par exemple la régulation de la croissance neuritique ou de l'élaboration des connections synaptiques.

Les études immunohistochimiques peuvent également nous renseigner sur un autre élément intéressant : la nature de la relation spatiale entre la CP et la reeline. Puisque la CP semble agir sur le profil protéique de la reeline, il se pourrait que ces deux protéines se retrouvent co-localisées. Une telle éventualité est soulevée notamment par une étude préliminaire de marquage par immunofluorescence de la CP et de la reeline, réalisée sur les neurones P19 en présence ou non de CP (Annexe E). Les résultats montrent que lors de la neuroaggrégation induite par la CP, des molécules de CP et de reeline peuvent se retrouver sous forme de petits foyers dans les neuroagrégats. Le double marquage n'a pas été fait mais

on peut penser que la CP et la reeline pourraient être co-localisées. Cette étude mérite d'être reprise.

### 9.3.2 Fragments de la reeline

Il existe encore peu de connaissances sur les relations structure-fonction de la reeline. Notons également que les sites exactes de clivages N-t et C-t de la reeline n'ont pas encore identifiés à ce jour, pas plus que l'identité des protéases qui sont responsables des clivages (Kohno *et al.*, 2009a). Les impacts biologiques de l'action stimulante de la CP sur la génération de la reeline 300K sont pour le moment inconnus. Une étude a montré que c'est la portion centrale de la reeline qui est nécessaire, voire suffisante, pour assurer son rôle durant le développement cortical (Jossin *et al.*, 2004). Le fragment de 300K, généré lors de la neuroaggrégation, est rapporté comme ayant conservé cette région centrale de la séquence peptidique en plus de la partie N-t. Il a été montré également que ce fragment peut lier ses récepteurs et induire la phosphorylation de Dab-1 (Jossin *et al.*, 2003). Il est donc possible que ce fragment de 300K, biologiquement fonctionnel, ait un rôle dans le développement neuronal, ce qui appuierait l'idée qu'une relation directe ou indirecte puisse exister entre la reeline, la CP ainsi qu'entre le phénomène de neuromigration et de neuroaggrégation.

Dans cette thèse, nous avons analysé les formes N-t de la reeline. Il n'est pas exclu que la présence (ou l'absence) des fragments complémentaires de la reeline, qui ne sont pas détectés au moyen de l'anticorps G10, puissent avoir un rôle non encore déterminé. À ce jour, il est connu que la portion C-t de la reeline est impliquée dans la stabilisation de la liaison de la reeline avec ses récepteurs (Kohno *et al.*, 2009b ; Nakano *et al.*, 2007). La forme 300K est dépourvue de la portion C-t et il a été proposé que cette forme soit biologiquement moins active (Kohno *et al.*, 2009a). Dans notre modèle, on voit apparaître la reeline 300K alors que la neuroaggrégation est bien installée (fig. 6.4). Une possibilité pourrait être qu'il s'agisse d'un mécanisme entraînant un arrêt ou un changement de fonction de la reeline. D'autre part, nos résultats montrent que l'ajout de l'anticorps CR-50 qui empêche la reeline de se lier à ses récepteurs et d'induire la phosphorylation de Dab-1, n'inhibe ni la neuroaggrégation, ni le clivage de la reeline (fig. 6.5). Ce résultat suggère que le clivage de la reeline soit une conséquence plutôt qu'une condition menant à la neuroaggrégation. Il n'est pas écarté que les

nouveaux fragments de reeline ainsi générés puissent avoir d'autres fonctions inconnues à ce jour.

Un impact intéressant des études *ex vivo* et *in vivo* présentées dans les deux premiers articles (chapitres VI et VII) est que leurs résultats ravivent l'intérêt à mieux comprendre le rôle des fragments de la reeline de même que les circonstances dans lesquelles ils sont générés. En ce sens, une étude histologique de cortex néonataux de souris *VLDLr*<sup>-/-</sup> et *ApoER2*<sup>-/-</sup> peut apporter des informations intéressantes. Les récepteurs VLDLr et ApoER2 auraient des rôles divergents au cours de la migration neuronale (Hack *et al.*, 2007). Le récepteur ApoER2 serait important dans la migration des neurones générés tardivement au cours de la corticogénèse, alors que le récepteur VLDLr serait impliqué dans l'inhibition de la migration neuronale. Plus précisément, la liaison de la reeline au récepteur VLDLr agirait comme signal d'arrêt de la migration des neurones, empêchant ceux-ci de migrer au-delà de la zone marginale. Ainsi, il serait très pertinent d'analyser le profil protéique de la reeline dans les souris *VLDLr*<sup>-/-</sup> et *ApoER2*<sup>-/-</sup> afin de voir si des liens/corrélations peuvent être dégagés entre l'apparition ou la disparition de fragments de la reeline, en portant une attention particulière à la forme 300K puisqu'elle est l'objet de cette thèse, et le comportement migratoire des neurones. Ces analyses pourraient apporter de nouveaux éléments pour mieux comprendre la signification biologique de la neuroagrégation et la production de la reeline 300K dans notre modèle neuronal P19.

### 9.3.3 Désordres neurologiques

À la lumière de nos résultats qui sous-tendent une relation entre la CP et la reeline dans le contexte du neurodéveloppement, nous avons, à partir de la littérature, investigué de quelle manière ces deux protéines se comportent dans diverses pathologies neurologiques en lien avec le développement du cerveau. Il existe des troubles neurologiques où les variations dans les niveaux d'expression de la reeline et de la CP ont été observées. Ces variations sont résumées dans le tableau 9.1. Il est intéressant de noter à priori qu'il existe des variations dans l'expression de la reeline et aussi de la CP dans différents troubles neurologiques.

**Tableau 9.1 Variation de l'expression de la reeline et de la CP dans des désordres neurologiques associés au neurodéveloppement**

Désordre neurologique	Reeline		CP		Références <sup>a</sup>
	<i>Cortex</i>	<i>Sérum</i>	<i>Cortex</i>	<i>Sérum</i>	
Schizophrénie	400K ↘ 300K ≈ 180K ≈	400K ↗ 300K ↗ 180K ↘	?	CP <sub>(protéine)</sub> ↗ CP <sub>(act.)</sub> ↗	Reeline : 1, 2 <sup>b</sup> CP : 3
Autisme	400K ↘ 300K ↘ 180K ↘	400K ↘ 300K ≈ 180K ↗	?	CP <sub>(protéine)</sub> ↘	Reeline : 4, 5 <sup>c</sup> CP : 6, 7
Lissencéphalie	?	400K ↘ 300K ↘ 180K ↘	?	?	8

Les symboles ↗, ↘ et ≈ indiquent respectivement une augmentation, diminution ou absence de changement par rapport à des sujets sains.

<sup>a</sup> Références : 1 = (Impagnatiello *et al.*, 1998); 2 = (Fatemi, Kroll et Stry, 2001); 3 = (Wolf, Kotun et Meador-Woodruff, 2006); 4 = (Fatemi *et al.*, 2005); 5 = (Fatemi, Stry et Egan, 2002); 6 = (Chauhan et Chauhan, 2006); 7 = (Parellada *et al.*, 2012); 8 = (Hong *et al.*, 2000)

<sup>b</sup> Dans l'étude de Fatemi et coll. (2001), la CP a été utilisée, au même titre que l'albumine, comme témoin de chargement sur gel d'électrophorèse, étant donné que ces deux protéines sont abondamment retrouvées dans le sérum sanguin. Les auteurs notent une augmentation de la CP dans le sérum des personnes schizophrènes mais ne font pas de la CP l'objet de leur étude en vue d'établir des corrélations entre la CP, la reeline et la schizophrénie.

<sup>c</sup> Dans l'étude de Fatemi et coll. (2002), la CP a été utilisée, au même titre de l'albumine, comme protéine plasmatique témoin afin de mesurer les variances de l'expression de la reeline entre les personnes autistes et celles ne souffrant pas de ce trouble neurologique. Les auteurs ne rapportent pas de différence significative de l'expression de la CP entre les autistes et les non-autistes. En aucun cas les auteurs font référence à l'établissement de corrélation entre la CP, la reeline et l'autisme.

Par exemple, on rapporte chez les personnes schizophrènes des niveaux sériques de reeline 400K et 300K élevés et de 180K plus faibles par rapport à une cohorte de personnes non-atteintes de schizophrénie (Fatemi, Kroll et Stry, 2001). Chez les personnes autistes, les niveaux sériques de 400K et 180K varient à l'opposé (Fatemi *et al.*, 2005). Selon que les niveaux d'expression de la reeline ont été mesurés à partir du sérum sanguin ou dans le cortex cérébral, les variations ne vont pas nécessairement dans le même sens. Ainsi, une étude de Fatemi *et al.* portant sur l'analyse des niveaux cortico-cérébraux de reeline chez les



les personnes autistes montre que les trois formes N-t de la reeline sont moins abondantes (Fatemi *et al.*, 2005), alors que dans le sérum les niveaux de la reeline 300K demeurent stables et ceux de la forme 180K augmentent, quoique de façon non-significative par rapport à une cohorte de gens normaux (Fatemi, Stry et Egan, 2002).

La lissencéphalie désigne un ensemble de maladies qui ont en commun la disparition de l'aspect habituel du cortex cérébral. Normalement, le cortex cérébral est traversé par des sillons et des scissures, ce qui lui donne un aspect convoluté. Le processus de formation des sillons et scissures se nomme la gyration. La lissencéphalie est une anomalie de la gyration, où la présence de sillons et de scissures est moindre voire inexistante. Le cortex cérébral a alors une surface d'apparence plutôt lisse. À cela s'ajoute une désorganisation des couches neuronales du cortex qui résulte de défauts survenus au cours de la migration neuronale. La lissencéphalie est classée parmi les maladies neurodéveloppementales et s'accompagne bien souvent de troubles neurologiques tels que le retard mental et de crises d'épilepsie chez les personnes qui en sont atteintes (Wynshaw-Boris *et al.*, 2010). L'analyse de l'expression de la reeline, à partir du sérum sanguin de personnes lissencéphaliques, montre une diminution du niveau des trois formes N-t de la reeline (Hong *et al.*, 2000). Bien que pour les trois troubles mentionnés on rapporte des modifications dans l'expression de la reeline 400K, 300K et 180K, la signification biologique de ces variations demeure pour le moment évasive.

Des modifications de l'expression de la CP ont aussi été relevées dans la schizophrénie et l'autisme. Il est rapporté que les niveaux de l'activité ferroxidasique de la CP mesurée dans le sang (Wolf, Kotun et Meador-Woodruff, 2006) de même que sa concentration en protéine (Fatemi, Kroll et Stry, 2001) est plus élevée chez les individus schizophrènes, alors que chez les autistiques, on dénote une diminution de la teneur en CP contenue dans le sérum sanguin (Chauhan et Chauhan, 2006 ; Parellada *et al.*, 2012). Il n'est pas exclu que les changements observés sur l'activité ou la concentration de la CP sérique puissent suggérer qu'il y ait également des variations dans l'expression de la CP au niveau du cerveau. De plus, à l'image de la reeline, les variations dans l'expression et l'activité de la CP pourraient aussi ne pas aller dans le même sens pour un trouble neurologique donné, selon que les mesures ont été effectuées à partir du sérum ou dans le cortex cérébral. En ce sens, d'autres études s'avèrent

nécessaires afin d'investiguer cet aspect. À ce jour, seules deux études - l'une portant sur la schizophrénie et l'autre sur l'autisme - ont analysé en parallèle l'expression de la CP et la reeline et ce, à partir du sérum sanguin. (Fatemi, Kroll et Stary, 2001 ; Fatemi, Stary et Egan, 2002). Il est à noter cependant que la CP a été analysée à titre de protéine plasmatique témoin, afin de mesurer les variations de l'expression de la reeline entre les personnes atteintes d'un trouble neurologique et celles qui ne le sont pas. En aucun cas les auteurs font référence à l'établissement de corrélation entre la CP, la reeline et le trouble neurologique concerné.

L'ensemble des données compilées dans le tableau 9.1 permet de remarquer qu'une augmentation de l'expression de la reeline 300K semble aller de pair avec une augmentation de l'expression ou de l'activité enzymatique de la CP, et inversement une diminution de la reeline 300K avec une diminution de la CP. Il s'agit d'une observation forte intéressante puisqu'elle semble en accord avec les résultats de cette thèse. Il apparaît pertinent que d'autres études visant l'analyse en parallèle de l'expression de la CP et la reeline soient réalisées dans le cortex de personnes atteintes de ces troubles neurologiques.

En ce qui concerne les maladies neurodégénératives, il est à souligner que chez les gens souffrant d'Alzheimer ou de Parkinson, peu de changements sont rapportés pour la reeline 400K et 300K mais la forme 180K tend à augmenter comparativement aux gens qui ne sont pas atteints de ces maladies. D'autre part, l'activité ferroxidasique de la CP semble diminuer chez les gens atteints d'Alzheimer (Botella-Lopez *et al.*, 2006 ; Connemann *et al.*, 2010 ; Kocherhans *et al.*, 2010). La CP pourrait avoir un effet protecteur contre la neurodégénération causée par les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Ces maladies sont associées à des conditions de stress oxydatif et les neurones de souris  $CP^{-/-}$  sont moins résistants à de telles conditions (Patel *et al.*, 2002).

Le profil d'expression de la reeline chez les individus atteints d'acéruoplasminémie n'est pas connu à ce jour. En ce sens, il devient intéressant, pour des fins de comparaison avec les souris  $CP^{-/-}$ , d'analyser l'expression de la reeline chez ces individus. Outre le fait que les personnes acéruoplasminémiques présentent certains symptômes qui peuvent s'apparenter à

ceux de maladies neurologiques (Xu *et al.*, 2004), aucun défaut neuroanatomique n'a été relevé jusqu'à présent chez ces personnes. Il faut cependant considérer qu'à l'image du profil d'expression de la reeline chez les souris  $CP^{-/-}$ , les personnes atteintes d'acéruloplasminémie pourraient exprimer la reeline et que conséquemment, les différences d'organisation structurelle des neurones dans le cortex pourraient être subtiles, voire inexistantes. D'autre part, si des différences anatomiques ne sont visibles qu'à l'âge embryonnaire, l'analyse sera difficile à réaliser durant cette période pour des raisons éthiques évidentes. De plus, puisqu'il n'y a pas de mortalité fœtale associée avec l'acéruloplasminémie, on aurait peu de cerveaux fœtaux post-mortem disponibles. L'analyse du profil de la reeline post-naissance dans le sérum ou le liquide céphalorachidien pourrait être une première étape réalisable. Concernant l'aspect histologique de l'organisation laminaire du cortex, le recours aux souris  $CP^{-/-}$  offre un moyen alternatif et justifié pour investiguer ce volet afin de consolider ou non les liens potentiels entre la CP et la reeline.

#### 9.4 Mécanisme des actions neuronales de la CP

Nous commençons à accumuler des informations concernant les mécanismes des actions neuronales de la CP dans le modèle cellulaire P19. Pour l'action neuroagrégate, nous savons que : (1) des sites accepteurs/récepteurs de la CP existeraient à la surface de neurones (Maltais *et al.*, 2003), (2) une protéase à sérine extracellulaire est impliquée, (3) l'action neuroagrégate est indépendante de la génération de la reeline 300K, et (4) la neuroagrégate est sensible aux niveaux d'AMPc et d'activité PKA. De plus, les ions de cuivre seraient nécessaires (section 9.4.2). Pour l'action sur la reeline, nous savons que la génération de la reeline 300K : (1) implique une protéase à sérine extracellulaire, (2) est indépendante de la neuroagrégate mais peut aussi être favorisée par le regroupement des neurones, et (3) dépend d'une activation (phosphorylation) précoce d'ERK1/2. Possiblement, la phosphorylation de la cofiline pourrait jouer un rôle dans l'une, l'autre ou les deux actions de la CP. Les prochaines sous-sections discutent de différents aspects des mécanismes mentionnés.

#### 9.4.1 Modulation par les voies AMPc/PKA et ERK1/2

Par une étude de criblage au moyen d'agents pharmacologiques ciblant des voies rapportées comme ayant une action possible dans la migration ou l'adhésion des neurones, nous montrons que l'AMPc et l'activité de PKA influencent la neuroaggrégation induite par la CP. Lorsque l'AMPc est ajouté aux neurones P19 en présence de CP, il empêche la neuroaggrégation de se produire (fig. 8.2). Les neurones s'étalent sur le support et projettent de nombreux neurites. D'autre part, l'ajout du H89, un inhibiteur de la voie AMPc/PKA qui agit en inhibant spécifiquement l'activité de PKA, dans les cultures de neurones P19 induit à lui seul la neuroaggrégation. On y distingue peu ou pas de longs neurites dans la culture, une observation qui prévaut également dans le cas de la neuroaggrégation induite par la CP (fig. 6.1), suggérant que la croissance neuritique n'y soit pas favorisée. Il est intéressant de noter que la voie de signalisation impliquant l'AMPc/PKA a été largement investiguée dans la régulation de la croissance neuritique (Aglah, Gordon et Posse de Chaves, 2008 ; Bogoch et Linial, 2008 ; Sanchez *et al.*, 2004). Une étude montre que l'activation de cette voie via notamment le 8-Br-AMPc, favorise le déploiement neuritique des neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires humaines NT2. La même étude montre aussi que l'ajout du H89 induit l'effet inverse (Tegenge, Roloff et Bicker, 2011). Nos résultats s'accordent donc avec ceux d'autres chercheurs. Des marqueurs neuritiques tels le neurofilament-M, MAP-2 ou GAP-43 pourraient s'avérer utiles pour étoffer l'analyse de la croissance des neurites en réponse à différents traitements (Bogoch et Linial, 2008 ; Evangelopoulos, Weis et Kruttgen, 2009 ; Schulz *et al.*, 2010).

On compte parmi les activateurs de la voie AMPc/PKA, le PACAP (Botia *et al.*, 2007). Dans le SNC en développement, le PACAP aurait notamment comme rôles d'inhiber la migration neuronale (Cameron *et al.*, 2007) et de favoriser le déploiement neuritique (Cameron *et al.*, 2009). Nous avons testé l'effet du PACAP dans les cultures de neurones P19 en présence ou non de la CP. Les résultats ont montré que le PACAP n'inhibe pas la neuroaggrégation de la CP, pas plus qu'il ne l'induit (non montré). Possiblement, les neurones P19 n'expriment pas les récepteurs du PACAP. Des agents pharmacologiques ont été utilisées pour identifier d'autres molécules signalétiques qui seraient impliquées dans la neuroaggrégation induite par la CP. L'activation ou l'inhibition de la PKG et la chélation du



calcium intracellulaire (BAPTA-AM) n'ont eu aucun effet. L'AMPc peut mener à l'activation de PKA mais aussi à celle de EPAC. L'ajout d'un activateur de EPAC n'a ni empêché la neuroaggrégation, ni la génération de la reeline 300K, de se produire en présence de la CP (fig. 8.2), indiquant que cette voie (AMPc/EPAC) n'est pas impliquée dans les actions neuronales de la CP.

En somme, la voie AMPc/PKA semble pour le moment la plus prometteuse pour étudier son implication dans l'action neuroaggrégative de la CP. Comme les inhibiteurs SBTI/Apro peuvent inhiber aussi bien la neuroaggrégation induite par la CP que celle induite par le H89 (fig. 8.3), nous pouvons nous demander si la même protéase agit dans les deux cas. Conséquemment, l'activation de cette protéase que l'on pourrait qualifier de « neuroaggrégative » semblerait ainsi dépendre d'une baisse de l'activité de PKA et donc, d'une diminution au préalable du niveau d'AMPc dans la cellule. La possibilité que la voie AMPc/PKA puisse influencer l'expression et/ou l'activité de protéase a déjà été rapportée. À titre d'exemple, une étude a investigué l'effet de l'AMPc sur l'expression de la MMP-9 et du tPA (Lee *et al.*, 2008). Les MMP sont bien connues pour leur implication dans le remodelage de la MEC et les processus de migration cellulaire. Il a été montré que l'ajout d'AMPc dans des cultures primaires astrocytaires module à la baisse l'activité de la MMP-9 et augmente celle du tPA (Lee *et al.*, 2008).

Il est intéressant de noter que deux études réalisées au milieu des années 1980 par un même groupe de recherche indiquaient que la CP influe sur les niveaux d'AMPc et de GMPc. Les influences vont dans des sens différents, mais les réponses sont peut-être dépendantes des organes analysés. Précisément, une étude montre que l'administration intra-péritonéale de CP chez des rats, 1 h avant que ceux-ci ne soient exposés à des radiations, induit une augmentation des niveaux d'AMPc et de GMPc dans la rate et le thymus 3 à 6 h suivant l'exposition aux radiations (Antonenko, Berdinskikh et Chebotarev, 1984). L'autre étude indique que l'administration de la CP chez des rongeurs, 1 h avant leur exposition au même type de radiations, induit plutôt une diminution des deux nucléotides cycliques dans le foie, alors que les radiations à elles seules font augmenter les niveaux d'AMPc et de GMPc (Antonenko, Sanina et Chebotarev, 1986). Il est fort probable que ce genre de traitement fait

sur les animaux (irradiation aux rayons X) puisse induire une multitude d'autres effets sur la biochimie des cellules et des tissus de l'animal, rendant questionnables les conclusions et les déductions pouvant être tirées de ce genre d'études. À tout le moins, celles-ci demeurent discutables sur le plan éthique et ne semblent heureusement pas avoir eu de suite.

Un curieux résultat de nos études est qu'une phosphorylation précoce de ERK1/2 (i.e. dans la première heure suivant l'ajout de la CP sur les neurones, figs 8.6 et 8.7) soit nécessaire à la génération de la reeline 300K, un événement qui se produit tardivement. Il pourrait être intéressant d'analyser l'impact d'un activateur de ERK, comme par exemple le (*E*)-2-benzylidène-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1*H*-indène-1-one (BCI), un stimulateur indirect de la phosphorylation de ERK (Molina *et al.*, 2009), sur la capacité de générer la reeline 300K.

#### 9.4.2 Implication des ions de cuivre de la CP

Un aspect des mécanismes d'action de la CP dans l'induction de l'agrégation des neurones P19 concerne les rapports structure-fonction de la CP. Une caractéristique structurale importante de la CP est la présence d'atomes de cuivre dans son assemblage (figs 1.1 et 1.2). Ceux-ci sont essentiels aux activités oxydasique et ferroxidasique de la CP (voir les sections 1.5.1 à 1.5.8). Ils sont aussi nécessaires pour l'action neuroagrégate de la CP. La CP dénaturée, i.e. dépouillée de ses atomes de Cu, ne peut induire la neuroagrégaion (Maltais *et al.*, 2003). Maltais *et al.* (2003) ont aussi testé l'effet de sels de cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ) et du complexe  $\text{His}_2\text{-Cu}$  sur leur capacité à induire la neuroagrégaion. Ces substances n'ont pas eu cette capacité d'induire la neuroagrégaion.

Il est intéressant de noter que le complexe  $\text{His}_2\text{-Cu}$ , mis au point par Dr B. Sarbar (*Hospital for Sick Children*, Toronto, Canada) sert à fournir du cuivre dans les organes de gens affectés par la maladie héréditaire de Menkes, laquelle crée une insuffisance de cuivre dans l'organisme à cause de la défectuosité d'un transporteur de cuivre intestinal. Également, il a été montré que le complexe  $\text{His}_2\text{-Cu}$  est capable de livrer le cuivre dans les cellules en culture avec une efficacité similaire à celle de la CP (Bianchini, Musci et Calabrese, 1999). Le transport transmembranaire du cuivre nécessite une interaction directe entre la CP et la



surface de la cellule (Bianchini, Musci et Calabrese, 1999), soulevant la présence d'un récepteur de la CP.

#### **9.4.3 Implication de récepteurs potentiels de la CP sur les neurones**

La CP est extracellulaire et peut donc interagir avec la surface de différents types cellulaires. À l'aide d'un test ELISA dans le modèle P19, Maltais et coll. (2003) ont soulevé la possibilité de l'existence de sites accepteurs/récepteurs de la CP à la surface des neurones. Une telle éventualité est supportée également par des travaux du Dr S. David qui montrent que les interactions neurone-neurone et neurone-astrocyte peuvent être perturbées en présence d'un anticorps anti-CP (Mittal et David, 1994b, 1994a). De plus, il a été montré *in vitro* que la migration des neurones sur les cellules gliales est considérablement réduite en présence de cet anticorps dans les cultures (Mittal et David, 1994b). Notons cependant que ces travaux ne se sont pas penchés sur la reeline.

Des travaux effectués au cours de ma maîtrise ont notamment porté sur l'identification et la caractérisation d'un récepteur neuronal potentiel de la CP, par chromatographie d'affinité sur CP-agarose, tant à partir d'extraits protéiques de neurones P19 qu'à partir d'homogénats de protéines totales de cerveaux de rats (Ducharme, 2007). Les résultats n'ont pas permis d'identifier clairement la présence d'un récepteur. D'autres conditions d'extraction de protéines membranaires ou de purification par chromatographie d'affinité pourraient être testées. Il se peut que la portion de la CP liée à l'agarose soit celle qui est reconnue par le récepteur. Une autre méthode d'immobilisation pourrait être testée pour éviter l'interférence stérique.

#### **9.4.4 Cibles distales de l'action de la CP**

Un sous-objectif de l'investigation du mécanisme des actions neuronales de la CP était d'identifier des cibles distales visées par l'action de la CP. Nous nous sommes intéressés à la cofiline à cause de son rôle sur la morphologie cellulaire et à cause du fait que sa phosphorylation est modulée par la reeline.

Les résultats montrent que les souris  $CP^{-/-}$  ont de plus faibles taux de phospho-cofiline (fig. 7.5). Nos résultats suivent ainsi une tendance similaire à la conclusion de Chai et coll., à l'égard du fait que la baisse d'expression de la reeline et/ou de ses fragments, est corrélée à une baisse de phospho-cofiline (Chai *et al.*, 2009b). D'autre part, nous avons déterminé le profil de phospho-cofiline dans le modèle P19 au cours de la neuroaggrégation induite par la CP. Les résultats montrent qu'un traitement des neurones avec la CP stimule la phosphorylation de la cofiline, entre 1 et 2 h suivant le début du traitement (fig. 7.6). Comme pour la reeline, il y aurait une corrélation entre le modèle P19 et les souris concernant la phosphorylation de la cofiline et la présence de la CP.

Le mécanisme de l'action de la reeline sur la cofiline passerait par l'activation du récepteur ApoER2 et de la phosphorylation de Dab-1 suivie de celle de la PI3K (Chai *et al.*, 2009a) (fig. 3.3). Nous pourrions déterminer si la PI3K serait aussi impliquée dans l'action de la CP sur la cofiline. Dans des contextes cellulaires n'impliquant pas la reeline, la phosphorylation de la cofiline est faite par la kinasase LIMK, et l'activité de LIMK est elle-même régulée par phosphorylation (Nadella *et al.*, 2009). LIMK possède trois sites de phosphorylation (Ser 323, Thr 508 et Ser 596) et la combinaison de résidus phosphorylés déterminera le niveau d'activation de LIMK. La phosphorylation de la Thr 508 dépend de la voie Rac/cdc42/Rho, celle de la Ser 596 de PKA et celle de la Ser 323 de PKA ou d'une autre voie impliquant ERK (voir la fig. 5 de Nadella et al.). Considérant que lors de la neuroaggrégation induite par la CP, la phosphorylation d'ERK1/2 (fig. 8.4) précède le plateau de phospho-cofiline (fig. 7.6), une possibilité serait que la phosphorylation augmentée de la cofiline durant la neuroaggrégation induite par la CP provienne d'une voie signalétique impliquant ERK1/2 et LIMK. Comme l'AMPc n'a pas eu d'impact sur la phosphorylation de ERK en présence de CP, il est logique de penser que PKA serait peu impliquée dans l'action de la CP sur la cofiline. L'implication de la voie Rac/cdc42/Rho pourrait être intéressante à investiguer en lien avec la phosphorylation de la cofiline.

Une autre cible intéressante en lien avec la reeline est la protéine Tau qui fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules. L'une des principales fonctions de la protéine Tau est d'interagir avec la tubuline afin de moduler la stabilité des microtubules et

donc les modifications de l'organisation cytosquelettique. La reeline aurait un effet protecteur dans la maladie d'Alzheimer en activant une voie de signalisation de la reeline qui mène à l'inhibition de l'activité de la GSK3 $\beta$ , une enzyme qui (hyper)phosphoryle Tau. La capacité de Tau à stabiliser les microtubules disparaît avec l'(hyper)phosphorylation (Deutsch, Rosse et Deutsch, 2006). Tau est particulièrement exprimée dans les neurones et impliquée dans le développement du cerveau (Dawson *et al.*, 2001 ; Fuster-Matanzo *et al.*, 2009 ; Sapir *et al.*, 2012). Toutefois, l'étude de Tau impose des considérations dont il faut tenir compte sur le plan expérimental. Il est à noter que dans le cerveau humain, il n'existe pas moins de 6 isoformes de Tau qui sont de plus exprimées différemment au cours du neurodéveloppement (Bullmann *et al.*, 2009). Une autre lourdeur technique dans l'étude de Tau est que cette protéine possède énormément de sites de phosphorylation (on en répertorie plus de 66) (Wang et Liu, 2008). Dans les stades embryonnaire et périnatal du développement du cerveau, Tau est hyperphosphorylée et pas moins d'une douzaine de sites (résidus Thr, Tyr et Ser) sont concernés (Wang et Liu, 2008). À cause de la complexité de l'étude de Tau, nous avons privilégié l'étude de la cofiline.

Il reste beaucoup à découvrir concernant les mécanismes d'action de la CP sur les neurones P19 et dans le cerveau en développement. Dans le modèle P19, les résultats obtenus en agissant sur les voies de signalisation AMPc/PKA et ERK1/2 ont permis de dissocier neuroaggrégation et génération de la reeline 300K, ce qui est un bon départ pour une étude approfondie des voies signalétiques impliquées dans les actions de la CP.

## **9.5 Le modèle P19, ses limites et d'autres modèles cellulaires pertinents**

Le modèle cellulaire P19 constitue jusqu'à ce jour un modèle bien établi de cellules souches embryonnaires. À l'image des cellules souches embryonnaires normales, les cellules P19 ont le potentiel de donner naissance à tous les types cellulaires de l'organisme de mammifère et sont donc dites pluripotentes (Rudnicki et Mc Burney, 1987). Mises en présence d'AR comme agent inducteur, elles peuvent se différencier facilement et efficacement en neurones. Les neurones P19 permettent de suivre l'acquisition de caractéristiques moléculaires, morphologiques et physiologiques spécifiques aux neurones normaux du SNC (Ulrich et Majumder, 2006).

Un grand avantage du modèle P19 est de permettre de circonscrire l'étude de la réponse neuronale, sans interférence avec d'autres cellules du système nerveux comme les cellules gliales. Cet avantage a aussi son revers : nous ne pouvons évaluer l'impact de la modulation des réponses cellulaires des neurones par l'interaction avec les cellules gliales et réciproquement. Une partie des informations sur ces modulations pourrait être accessible en étudiant le modèle P19 au-delà du jour 6 du protocole de neurodifférenciation, plus particulièrement à partir de J9 de la différenciation, i.e. lorsque des cellules gliales comme les astrocytes apparaissent dans les cultures (Yuahasi *et al.*, 2012). Il faut tenir compte toutefois que l'action agrégative de la CP devient moins prononcée avec des cultures de neurones P19 plus âgés (i.e. de J6 *versus* J4) (Maltais *et al.*, 2003), indiquant que la fenêtre de temps semble un facteur limitant dans l'étude de l'action agrégative de la CP. À tout le moins, il serait intéressant de vérifier si les cellules gliales P19 expriment la CP, ce qui pourrait consolider l'idée que les neurones P19 peuvent effectivement être disposés à répondre à la CP lorsqu'elle est présente.

Ultimement, il serait intéressant de disposer d'autres modèles neuronaux plus complets et/ou qui se rapprochent davantage des conditions qui prévalent durant le neurodéveloppement *in vivo*. Cependant, pour choisir de bons modèles, il faut tenir compte de certaines caractéristiques. D'après les résultats *in vivo* cumulés jusqu'à présent, la CP semble avoir un impact sur la reeline au cours de la corticogénèse. Ainsi, les cultures primaires de neurones embryonnaires, à partir de tranches de tissu cortical, s'avèrent un choix à préconiser. D'autre part, il est envisageable de recourir à des modèles de co-cultures, notamment composés de neurones et d'astrocytes (type de cellules gliales qui expriment la CP-GPI). Dans cette optique, l'influence de milieux conditionnés par des astrocytes sur les actions neuronales de la CP pourrait être évaluée. Notons que les cultures primaires exigent le sacrifice d'animaux. Les études pionnières faites avec le modèle P19 permettent l'économie d'animaux et le repérage des expérimentations pertinentes à valider dans des cultures primaires.

Une autre possibilité serait de tester l'effet agrégatif de la CP dans des modèles humains

de différenciation neuronale. Citons en exemple les cellules de carcinome embryonnaire NT2 qui peuvent être différenciées en neurones au moyen de l'AR comme agent inducteur. Tout comme le modèle P19, le modèle NT2 permet d'étudier les étapes clés du neurodéveloppement telles que la différenciation, la prolifération, la migration et la maturation des neurones (Tegenge, Roloff et Bicker, 2011). Un autre modèle humain de cellules souches embryonnaires, le modèle H9, peut également servir à l'étude de la différenciation neuronale avec comme agent inducteur l'AR. Ce modèle permet d'obtenir des neurones qui expriment des marqueurs de neurones naissants, mais aussi des astrocytes et des oligodendrocytes. Il est à noter cependant que le protocole de neurodifférenciation des cellules H9 est plus complexe et s'étale sur une plus longue période de temps que le modèle P19 (Chang *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2001).

## 9.6 Conclusion

Le développement du cerveau à partir des cellules souches embryonnaires est un processus hautement organisé. Il dépend de plusieurs étapes cruciales qui font intervenir diverses molécules comme des facteurs de croissance, des protéases, des molécules d'adhésion cellulaire et de guidance ainsi que des composantes de la matrice extracellulaire. Les équipes de recherche des Drs Paquin et Mateescu avaient observé que la CP induit l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires P19 (Maltais *et al.*, 2003). Considérant cette action de la CP sur des neurones P19 ainsi que son expression dans le cerveau, nous avons émis l'hypothèse que la CP pouvait avoir un rôle dans le développement du système nerveux. Cette thèse a cherché à mettre en évidence des éléments qui appuient l'existence d'un tel rôle de la CP, et à définir certains mécanismes de son action neuroagréative dans le modèle P19.

Nous avons trouvé des éléments qui s'accordent avec un rôle développemental de la CP dans le cerveau. D'abord, il y a une relation entre la présence ou l'absence de CP et l'expression de la reeline, une protéine essentielle au bon positionnement des neurones lors du développement. Ainsi, la CP modifie le profil d'expression de la reeline dans le modèle P19 en stimulant la génération du fragment de 300K et, parallèlement, l'absence de CP est associée à une réduction de la reeline 300K dans le cerveau embryonnaire de souris. Ensuite,



comme dans le cas des souris déficientes en reeline, les souris déficientes en CP ont de plus faibles niveaux de phosphorylation de la cofiline. En harmonie avec ces observations, la CP stimule la phosphorylation de la cofiline dans les neurones P19. Il est dommage que l'on ne connaisse pas le rôle spécifique des différentes formes de la reeline dans le développement parce que cela limite la compréhension du rôle développemental de la CP qui serait relié à son impact sur la reeline. Une contribution latérale originale de la thèse est la détermination du profil ontogénique des formes N-t de la reeline (i.e. les formes qui conservent la terminaison-N native) dans le cerveau normal. Une observation intéressante à cet égard est le profil particulier de la reeline 300K en comparaison de ceux de la reeline 400K et 180K. Ainsi, la reeline 300K montre deux pics d'expression, l'un important avant la naissance, l'autre plus faible après la naissance, et les deux pics sont séparés par une période de très faible expression.

Grâce à l'utilisation de modulateurs signalétiques, les résultats de la thèse révèlent aussi que l'influence de la CP sur l'expression de la reeline dans le modèle cellulaire P19 peut se faire de façon indépendante de la neuroaggrégation. Ainsi, l'activation de la voie AMPc/PKA n'inhibe que la neuroaggrégation alors que l'inhibition de la voie ERK1/2 n'inhibe que la génération de la reeline 300K. Par contre, ces deux actions trophiques de la CP impliquent chacune une protéase à sérine qui peut être ou non commune et dont l'identité est à déterminer. Nous avons donc obtenu quelques informations concernant le mécanisme des actions neuronales de la CP *ex vivo* mais la signification biologique de l'effet neuroaggrégatif demeure encore inconnue, d'autant plus que cet effet semble indépendant du clivage de la reeline. Notre compréhension pourrait être limitée par le fait que les cultures de neurones ne rendent pas compte de la complexité cellulaire du tissu nerveux. Notons que l'AMPc qui est connue pour ses effets sur la motilité et la connectivité des neurones a inhibé l'action neuroaggrégative de la CP en favorisant l'étalement des neurones P19 et la formation d'un réseau neuritique, ce qui constitue une autre association concordante entre la physiologie et l'*ex vivo*.

L'ensemble de ce travail souligne la pertinence d'investiguer le rôle de la CP dans le développement du système nerveux et identifie le modèle cellulaire P19 comme outil

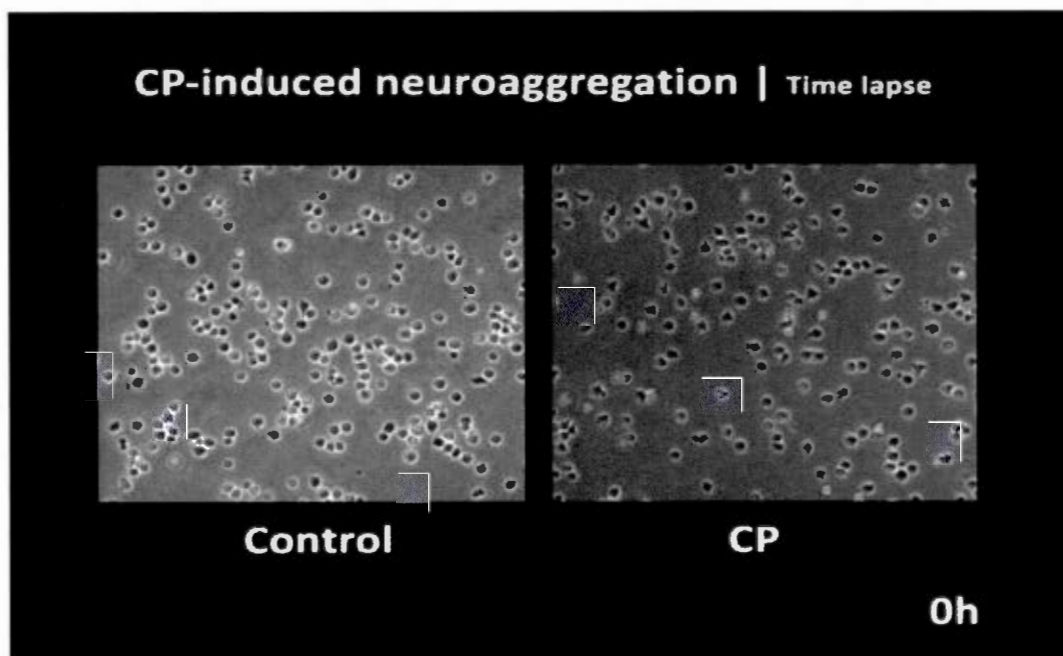


intéressant pour évaluer certains aspects des mécanismes de la neuroagrégation et de la génération de la reeline 300K. Les résultats soulèvent des questions très pertinentes dont la portée peut intéresser bien des chercheurs oeuvrant dans le domaine des neurosciences, notamment en ce qui concerne les connaissances entourant les fonctions de la reeline et de ses fragments. La CP exprimée dans le cerveau aurait-elle un rôle particulier dans le développement du cerveau qui s'ajoute à celui de régulateur du métabolisme du fer ? Les réflexions qui pourront émerger de ces questions constitueront le terreau fertile pour faire naître de nouvelles idées de recherche à valider expérimentalement.

Enfin, les nouvelles connaissances issues de cette thèse pourront contribuer à un ensemble plus vaste de connaissances entourant le développement du cerveau, et permettre ultimement de mieux comprendre certaines maladies associées à un développement neuronal défectueux.

### ANNEXE 1 : Vidéo de la cinétique de la neuroagrégation induite par la CP

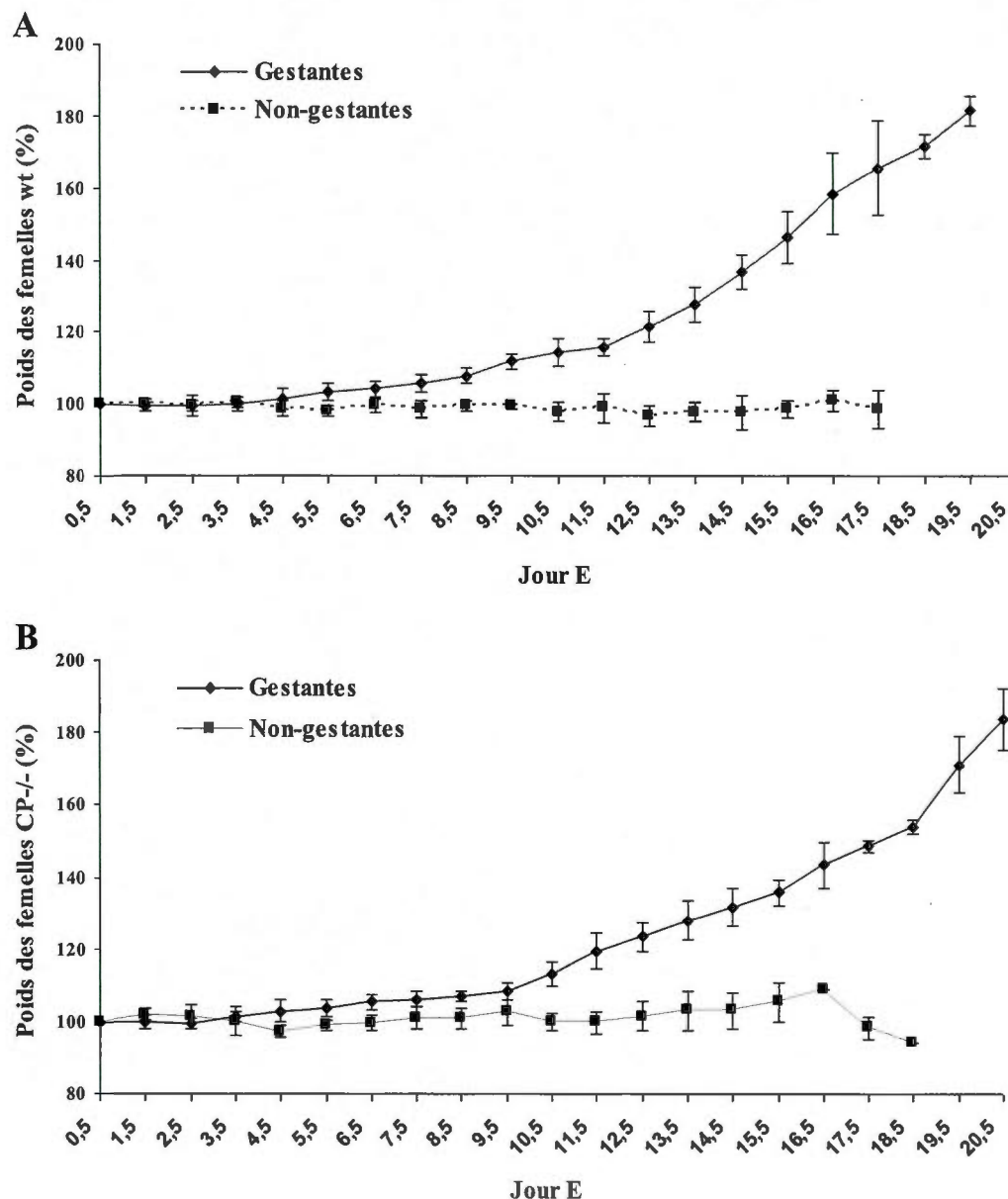
De façon routinière, nous évaluons la neuroagrégation au bout de 48 h de traitement des cultures de neurones P19 avec la CP. Une vidéo a été réalisée pour comparer l'évolution des cultures non traitées et des cultures traitées avec la CP, en temps réel sur la période de 48 h et pour déterminer le moment où apparaît une différence entre les deux cultures. Nous commençons à voir une différence à partir de 8 h de traitement environ.



**Figure A.1 Vidéo « Time Lapse » de la neuroagrégation induite par la CP.** Les neurones P19 ont été filmés des jours 4 à 6 (durée: 46 h) au moyen du microscope Nikon Éclipse Ti, équipé d'une caméra Nikon Digital Sight (DS)-U2, et du programme d'acquisition et d'analyse d'images NIS-Elements Advanced Research 3.0. Les neurones sont maintenus sous atmosphère et température contrôlés (95 % air/5 % CO<sub>2</sub>, à 37°C) au moyen d'une chambre à culture pour microscope INU-ONICS-F1 (Tokai Hit, Shizuoka, Japon). Montage vidéo réalisé avec le programme Adobe Premiere Pro 7.0. Voir la vidéo sur le CD fourni.

## ANNEXE B : Courbes de croissance du poids des souris gestantes

Au cours de mes expérimentations avec les animaux, j'ai développé une méthode afin de déterminer avec une meilleure exactitude le jour de gestation d'une femelle qui a été préalablement mise en accouplement. Cette méthode repose sur la prise quotidienne du poids des femelles, suivant l'observation d'un bouchon vaginal indiquant qu'il y a eu activité sexuelle. Ces données m'ont permis de dresser une courbe de croissance du poids des femelles gestantes, tant pour les souris de type sauvage que les souris  $CP^{-/-}$  (panneaux A et B respectivement). Ces profils pourraient permettre de suivre d'autres femelles en gestation afin de confirmer leur stade de grossesse et le jour de fécondation (E0.5). Cette méthode s'est avérée très utile dans les cas où le moment de conception (i.e. E0,5) n'a pu être déterminé/vérifié avec certitude. Également, il arrive souvent qu'un examen visuel ne permette pas de conclure de manière sûre si une femelle est gestante en deça de E12. Ainsi, cet outil complémentaire a été pratique pour valider la gestation d'une femelle avant même l'apparition des premiers changements physiques annonciateurs de cet état (e.g. gonflement de l'abdomen, développement mammaire, distention abdominale), puisque la variation du poids devient significative dès E7.5 (sauvage) et E8.5 ( $CP^{-/-}$ ). Enfin, il arrive dans d'autres cas que la femelle ait été accouplée sans que cela mène à une gestation, ou encore que des problèmes durant la gestation aient menés à un avortement spontané. À ce propos, il est à souligner que le succès d'accouplement/mise bas des souris de souche C57BL/6 est de l'ordre de 50 %. En définitive, le suivi quotidien du profil de croissance du poids des femelles possiblement en gestation a permis de réduire le nombre des femelles à euthanasier pour fins de prélèvement des embryons. En effet, les femelles qui ne prenaient pas de poids étaient remises en accouplement plutôt que d'être sacrifiées pour rien. De plus, ce suivi a permis de confirmer avec exactitude les jours embryonnaires de prélèvement des embryons, ce qui a optimisé l'obtention des échantillons nécessaires pour réaliser l'étude (moins d'animaux que prévu pour obtenir tous les résultats). Ce raffinement des procédures a été fort apprécié par le Comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) et cette façon de faire a été adoptée par d'autres équipes de recherche.

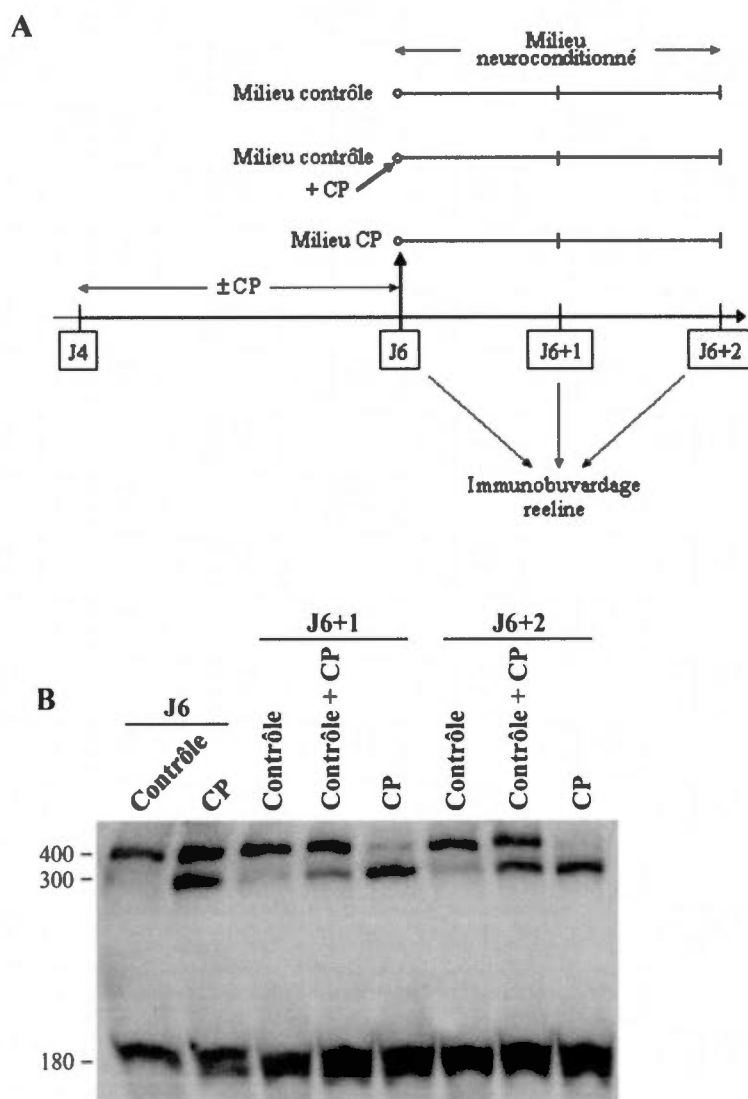


**Figure A.2 Courbes de croissance du poids des souris gestantes.** Suivant la mise en accouplement de femelles et l'observation d'un bouchon vaginal, celles-ci ont été suivies quotidiennement par la prise de leur poids. Les données recueillies ont permis de dresser un profil de la croissance du poids des souris gestantes, tant pour les souris (A) de type sauvage que (B)  $CP^{-/-}$ . Les données sont exprimées en pourcentage du poids de la souris déterminé à E0.5 (=100 %). Une version électronique est fournie (CD).

### **ANNEXE C : Étude sur le clivage de la reeline dans les milieux conditionnés par les neurones P19**

Nous avons généré des milieux de culture neuroconditionnés en absence (Contrôle) et en présence de la CP. Nous avons enlevé les cellules et continué l'incubation un ou deux jours de plus. De la CP a aussi été ajoutée dans le milieu neuroconditionné Contrôle avant l'incubation supplémentaire. Cette expérimentation voulait déterminer si la protéase responsable de la génération de la reeline 300K était une protéase à diffusion libre dans le milieu ou une protéase associée à la membrane plasmique des neurones. Les résultats sont présentés dans la figure A.3.

Le milieu Control de jour (J) 6 contient peu de reeline 300K, et des incubations prolongées ne changent pas la situation (voir les pistes Control pour J6, J6+1 et J6+2). L'ajout de la CP dans le milieu Contrôle permet de générer la reeline 300K même en absence de neurones (voir les pistes Contrôle+CP pour J6+1 et J6+2). Ce résultat suggère l'implication d'une protéase neuronale qui diffuse librement dans le milieu extracellulaire plutôt que celle d'une protéase associée à la membrane des neurones. Cette protéase neuronale serait activée par la CP. Remarquons que les niveaux de reeline 300K dans les milieux Contrôle+CP de J6+2 atteignent ceux des milieux CP de J6 (dans les deux cas, il y a eu 48 h de contact entre la reeline et la CP). Dans le milieu déjà neuroconditionné avec de la CP, on observe une réduction des niveaux de la reeline 400K (voir les pistes CP pour J6+1 et J6+2). Cette réduction semble se faire au profit de la 300K. Les résultats obtenus pour les incubations prolongées Contrôle+CP et CP n'écartent pas la possibilité de l'existence d'une protéase contaminante dans la préparation de CP.



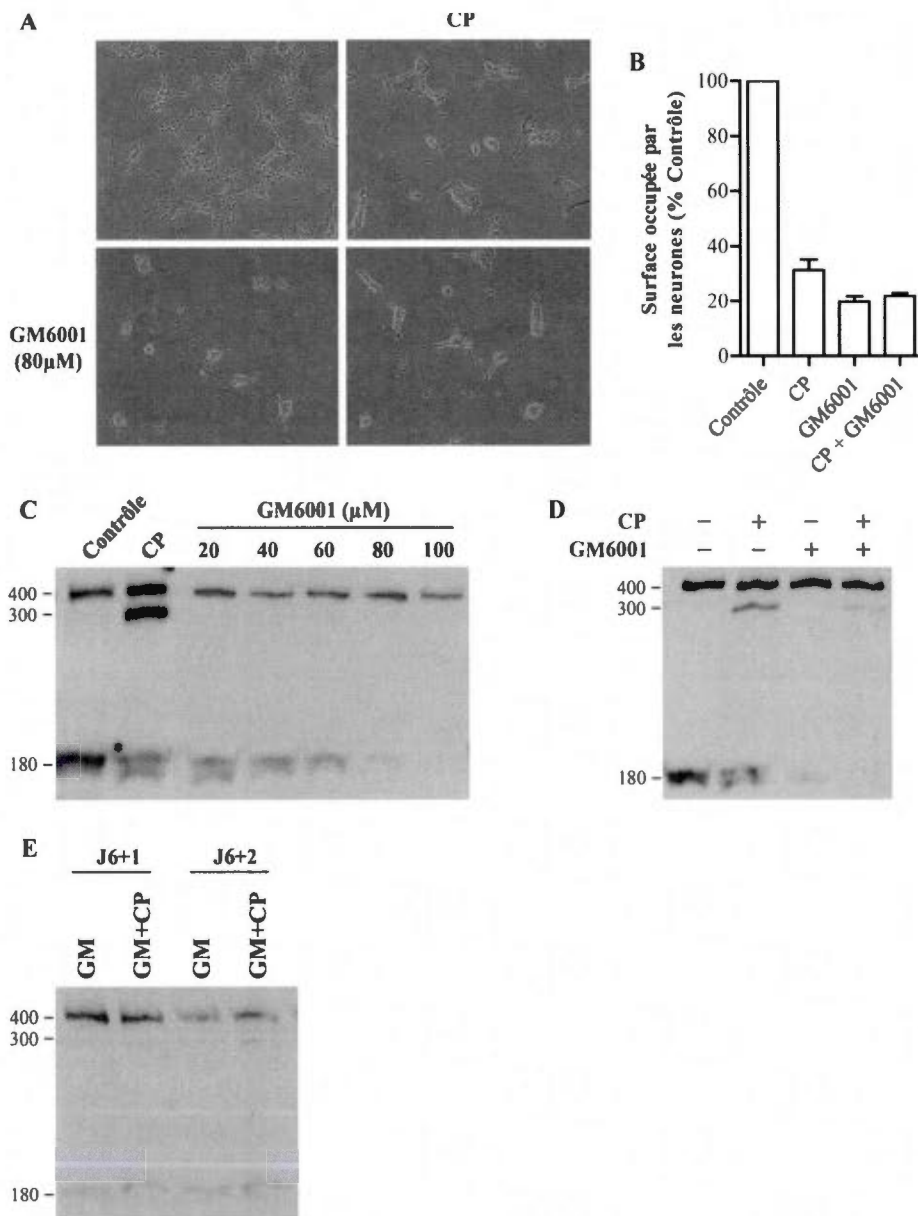
**Figure A.3 Étude sur le clivage de la reeline dans les milieux conditionnés par les neurones P19.** (A) Description de la procédure expérimentale. Les neurones P19 de jour (J) 4 ont été incubés pendant 2 jours en absence (Contrôle) ou en présence de la CP (CP). À J6, les cellules ont été enlevées et les milieux neuroconditionnés Contrôle et CP ont été réincubés sans les cellules pendant un ou deux jours supplémentaires. De la CP a aussi été ajoutée dans le milieu neuroconditionné Contrôle (Contrôle+CP). Les milieux des J6, J6+1 et J6+2 ont été analysés par immunobuvardage de la reeline avec l'anticorps anti-reeline G10. (B) Immunobuvardage (n=3). Une version électronique est fournie (CD).



#### **ANNEXE D : Analyse de l'effet de l'inhibiteur GM6001 sur l'expression de la reeline**

L'équipe de Jossin *et al.* (2007) a montré que l'ajout d'un inhibiteur général de métalloprotéases, le GM6001, sur des tranches de tissu cortical prélevé à E13 entraîne une désorganisation des couches neuronales, semblable à celle qui prévaut dans le phénotype *reeler*. Plus encore, il est montré que cet inhibiteur empêche la formation de la reeline 180K. Les auteurs concluent que le clivage de la reeline au site N-t (responsable de la génération du 180K) dépend d'une métalloprotéase sécrétée par les neurones et que ce blocage de la protéolyse de la reeline serait en cause dans la perturbation de l'organisation des couches neuronales (Jossin, Gui et Goffinet, 2007). Cette étude suggère donc que le clivage protéolytique de la reeline est important dans l'organisation neuronale.

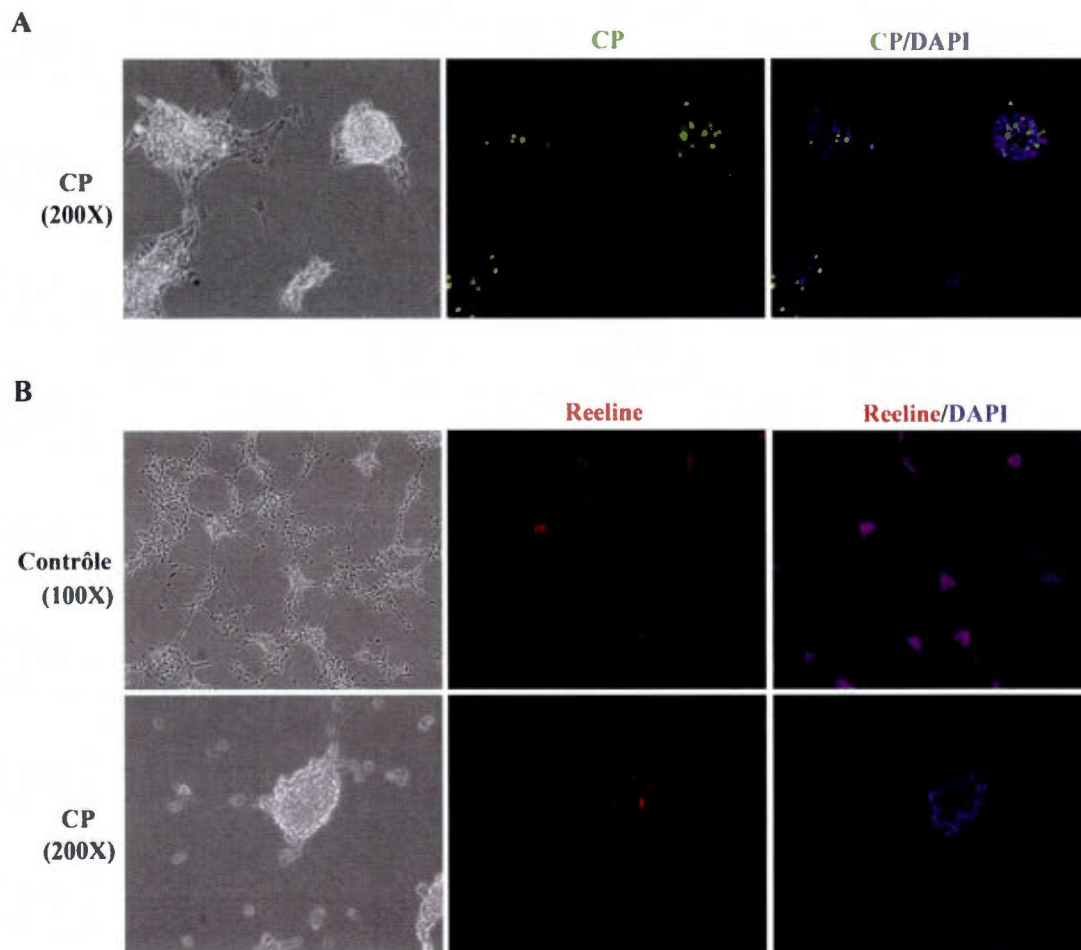
Nous avons vérifié l'effet de cet inhibiteur sur les neurones P19 en présence de CP. L'inhibiteur GM6001 n'empêche pas la neuroaggrégation induite par la CP; au contraire, il induit une neuroaggrégation qui ressemble à celle induite par la CP (panneaux A et B). En absence de CP, le GM6001 inhibe le clivage N-t de la reeline (et donc la formation du fragment de 180K) et cela, de façon concentration dépendante (panneau C). Une concentration de 80  $\mu$ M du GM6001 avait été utilisée sur des cultures primaires de neurones par d'autres chercheurs et avait conduit aussi à une inhibition de la génération de la reeline 180K (Jossin *et al.*, 2007). Le GM6001 inhibe aussi la génération de la reeline 300K induite par la CP (panneau D). L'ajout de CP au milieu conditionné GM induit peu la formation de 300K reeline (panneau E) contrairement au milieu neuroconditionné Contrôle (Annexe C, panneau B). Les résultats en D et E soulèvent la possibilité que le clivage C-t de la reeline pour former le fragment de 300K se produit mieux en présence de 180K. Cela irait dans le sens des observations faites par (Hibi et Hattori, 2009). Selon les travaux de ces chercheurs, le fragment de 180K est formé intracellulairement suite à l'endocytose de la reeline liée à ses récepteurs, puis relâché dans la MEC. On pourrait penser que la présence du 180K dans la MEC conditionne les neurones à former du 300K. Les résultats en D et E peuvent aussi suggérer qu'une métalloprotéase est impliquée dans la formation de la reeline 300K comme dans celle de la reeline 180K. Cette métalloprotéase pourrait activer une protéase à sérine ou, inversement, être activée par une telle protéase.



**Figure A.4** Analyse de l'effet de l'inhibiteur GM6001 sur l'expression de la reeline. Les neurones de jour (J) 4 ont été incubés pendant 2 jours en absence ou en présence de la CP et de l'inhibiteur GM6001. (A,B) Photographies des cellules à J6 et évaluation de la surface qu'elles occupent. (C-E) Immunobuvardages de la reeline dans les milieux de culture. En C, différentes concentrations de GM6001 ont été testées en absence de CP (n=2). En D, le GM6001 (80 μM) a été combiné ou non à la CP (n=3). En E, les milieux neuroconditionnés en présence de GM6001 (GM; 80 μM de jour 4 à jour 6) ont été incubés pendant 1 ou 2 jours supplémentaires sans les cellules, et en absence ou présence de CP (N=2). Une version électronique est fournie (CD).

## **ANNEXE E : Étude de localisation de la CP et la reeline par immunofluorescence dans les cultures de neurones P19**

La CP a un effet sur la reeline dans les cultures neuronales P19 et apparaît à peu près en même temps que la reeline dans le cerveau embryonnaire. Il est possible que ces deux protéines extracellulaires soient voisines l'une de l'autre comme elles peuvent aussi être spatialement éloignées mais signalétiquement reliées par une série de molécules intermédiaires. Dans une étude préliminaire de microscopie d'immunofluorescence sur les neurones P19, nous avons comparé la distribution des deux protéines. Les résultats montrent que dans les cultures traitées avec la CP, des molécules de CP sont présentes sous forme de petits foyers dans les neuroagrégats. Dans les cultures non-traitées avec la CP, il n'y a bien sûr pas de CP mais la reeline est associée à plusieurs neurones à travers toute la culture. Dans les neuroagrégats formés par traitement avec la CP, on observe la présence de petits foyers de reeline comme c'était le cas pour la CP. Le double marquage de la CP et la reeline n'a pu être réalisé mais on peut penser que la CP et la reeline pourraient être co-localisées. Peut-être les neurones qui ont des récepteurs pour la reeline sont aussi ceux qui ont des récepteurs/accepteurs pour la CP. Cette étude mérite d'être reprise.



**Figure A.5 Étude par immunofluorescence portant au niveau des localisations de la CP et de la reeline dans les cultures de neurones P19.** Les neurones P19 ont été cultivés en présence ou non (Contrôle) de la CP, des jours 4 à 6 du protocole de neurodifférenciation P19. Les cellules ont été fixées au jour 6 puis incubées avec les anticorps anti-CP suivi d'anti-FITC, ou anti-reeline G10 suivi d'anti-TRITC. Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI. (A) IF CP: des foyés peuvent être aperçus dans les agrégats de neurones, signalant la présence de la CP. Aucun marquage n'est observé dans les cultures contrôles. (B) IF reeline: en condition contrôle, la reeline extracellulaire est distribuée uniformément dans la culture autour des neurones. En présence de CP, la reeline extracellulaire forme des foyés semblables à ceux observés en A. Le double marquage CP/reeline n'a pu être réalisé (difficultés techniques). Possibilité qu'il y ait convergence (*merge*) de la CP et de la reeline, ce qui indiquerait une colocalisation des deux protéines et renforcerait l'idée que ces deux protéines ont une relation entre elle (direct ou indirecte par l'intermédiaire d'une protéase par exemple). Une version électronique est fournie (CD).

## ANNEXE F : Autre contribution

TOXICOLOGICAL SCIENCES 113(1), 116–126 (2010)  
doi:10.1093/toxsci/kfp043  
Advance Access publication October 6, 2009

### P19 Neuronal Differentiation and Retinoic Acid Metabolism as Criteria to Investigate Atrazine, Nitrite, and Nitrate Developmental Toxicity

Mathieu Solari,\* Joanne Paquin,† Philippe Ducharme,† and Monique Boily\*<sup>1</sup>

<sup>\*</sup>Département des Sciences Biologiques, and <sup>†</sup>Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada. Fax: 514-987-4647. E-mail: boily.monique@uqam.ca

Received July 24, 2009; accepted September 16, 2009

Atrazine and nitrogenous fertilizers are agrochemical contaminants frequently detected in water systems in North America. Several studies reported their ability to affect amphibian and mammalian development. Retinoids, supplied in the diet or synthesized by cells, are essential to embryogenesis. Disturbance of their homeostasis may lead to teratogenic effects. Retinoic acid (RA) is a major retinoid regulator of cell proliferation and differentiation. Previous studies reported alterations of retinoid stores in bullfrogs of Yamaska River subwatersheds (Québec, Canada), a region of intensive agricultural activities associated with atrazine, nitrate, and nitrite contaminants. These contaminants could affect RA metabolism and RA-mediated processes. Mouse P19 embryonic stem cells, which can differentiate to neurons in response to RA, were used to test this hypothesis. Cells were cultured in the absence or presence of contaminants during neuroinduction with RA and assayed by flow cytometry for expression of stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA1) (embryonic marker) and  $\beta$ III-tubulin (neuronal marker). Cell cultures were also analyzed for RA metabolism by high performance liquid chromatography (HPLC). Downregulation of SSEA1 paralleled  $\beta$ III-tubulin upregulation in an RA concentration-dependent manner. Atrazine, nitrate, and nitrite did not affect differentiation at environmentally encountered micromolar concentrations. However, low molar nitrite prevented RA-induced SSEA1 downregulation and decreased  $\beta$ III-tubulin appearance. Decreased cell viability/proliferation accompanied these differentiation effects. P19 cells metabolized RA to polar retinoids. RA metabolism was not affected at any concentration of atrazine, nitrate, or nitrite. Environmentally relevant levels of these contaminants, thus, had no gross effect on neurodifferentiation and RA catabolism of embryonic stem cells. P19 cell-based bioassays may provide valuable tools in monitoring developmental toxicity.

**Key Words:** agrochemical contaminants; retinoids; bioassay; flow cytometry; HPLC.

(*atRA*) is the active metabolite of retinol (vitamin A), an essential micronutrient for the growth and embryonic development of vertebrates (Zile, 2001). *atRA* acts mainly through binding to nuclear retinoic acid (RA) receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs). RAR and RXR dimers are the functional units regulating gene expression in diverse biological processes, including cell growth and differentiation (Zile, 2001). Enzymes involved in RA homeostasis also contribute to the retinoid effect (Napoli *et al.*, 1995). They control *atRA* levels and can generate active retinoid metabolites. For example, 4-oxo-RA, the product of Cytochrome P (CYP) 450/CYP26-mediated *atRA* hydroxylation and oxidation, is teratogenic (Pijnappel *et al.*, 1993). Retinoids have been extensively analyzed as biomarkers of teratogenicity but mainly in *in vivo* studies done on persistent contaminants such as organochlorines (Boily *et al.*, 2003; Novák *et al.*, 2008; Zile, 1992). Effects of less-persistent agrochemicals on retinoids have seldom been investigated despite their wide use. Recent studies with male bullfrogs captured from the Yamaska River basin (Québec, Canada) revealed that retinoid homeostasis was affected by agricultural practices. Lower hepatic retinyl palmitate and higher plasmatic retinol levels were associated with sites exhibiting higher levels of agrochemicals in their surface waters (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005). These results were related to enzyme activities responsible for hydrolysis of retinyl palmitate and esterification of retinol (Boily *et al.*, 2009). Elevated plasma 13-*cis*-4-oxo-RA values also suggested a greater oxidizing activity. Highly contaminated sites had higher concentrations of atrazine (Bérubé *et al.*, 2005), nitrate, and nitrite (Spear *et al.*, 2009).

Atrazine, a post-emergent herbicide, is one of the most widely used pesticides in North American corn production. Its



## BIBLIOGRAPHIE

- Aglah, C., T. Gordon et E. I. Posse de Chaves. 2008. «cAMP promotes neurite outgrowth and extension through protein kinase A but independently of Erk activation in cultured rat motoneurons». *Neuropharmacology*, vol. 55, no 1, p. 8-17.
- Al-Timimi, D. J., et T. L. Dormandy. 1977. «The inhibition of lipid autoxidation by human caeruloplasmin». *Biochem J*, vol. 168, no 2, p. 283-288.
- Alcantara, S., M. Ruiz, G. D'Arcangelo, F. Ezan, L. de Lecea, T. Curran, C. Sotelo et E. Soriano. 1998. «Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse». *J Neurosci*, vol. 18, no 19, p. 7779-7799.
- Aldred, A. R., A. Grimes, G. Schreiber et J. F. Mercer. 1987. «Rat ceruloplasmin. Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis». *J Biol Chem*, vol. 262, no 6, p. 2875-2878.
- Alessandri, G., K. Raju et P. M. Gullino. 1983. «Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo». *Cancer Res*, vol. 43, no 4, p. 1790-1797.
- Almonte, A. G., et J. D. Sweatt. 2011. «Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior». *Brain Res*, vol. 1407, p. 107-122.
- Alvarez-Dolado, M., M. Ruiz, J. A. Del Rio, S. Alcantara, F. Burgaya, M. Sheldon, K. Nakajima, J. Bernal, B. W. Howell, T. Curran, E. Soriano et A. Munoz. 1999. «Thyroid hormone regulates reelin and *dab1* expression during brain development». *J Neurosci*, vol. 19, no 16, p. 6979-6993.
- Amato, S., et H. Y. Man. 2011. «Bioenergy sensing in the brain: the role of AMP-activated protein kinase in neuronal metabolism, development and neurological diseases». *Cell Cycle*, vol. 10, no 20, p. 3452-3460.
- Anderson, G. J., D. M. Frazer, A. T. McKie et C. D. Vulpe. 2002. «The ceruloplasmin homolog hephaestin and the control of intestinal iron absorption». *Blood Cells Mol Dis*, vol. 29, no 3, p. 367-375.
- Antonenko, S. G., N. K. Berdinskikh et E. E. Chebotarev. 1984. «[Participation of cyclic nucleotides in realizing the effect of ceruloplasmin during irradiation]». *Radiobiologiya*, vol. 24, no 3, p. 334-336.



- Antonenko, S. G., N. K. Berdinskikh, E. D. Shishko et E. N. Okolot. 1985. «[Immunomodulating action of ceruloplasmin in tumor growth and the participation of cyclic nucleotides]». *Vopr Onkol*, vol. 31, no 5, p. 48-52.
- Antonenko, S. G., O. L. Sanina et E. E. Chebotarev. 1986. «[Cyclic nucleotides and lipids in the realization of the radioprotective effect of ceruloplasmin]». *Radiobiologiya*, vol. 26, no 1, p. 112-115.
- Aouffen, M., J. Paquin, E. De Grandpre, R. Nadeau et M. A. Mateescu. 2001. «Deglycosylated ceruloplasmin maintains its enzymatic, antioxidant, cardioprotective, and neuronoprotective properties». *Biochem Cell Biol*, vol. 79, no 4, p. 489-497.
- Arber, S., F. A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C. A. Stanyon, O. Bernard et P. Caroni. 1998. «Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase». *Nature*, vol. 393, no 6687, p. 805-809.
- Askwith, C., et J. Kaplan. 1997. «An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*». *J Biol Chem*, vol. 272, no 1, p. 401-405.
- Assadi, A. H., G. Zhang, U. Beffert, R. S. McNeil, A. L. Renfro, S. Niu, C. C. Quattrocchi, B. A. Antalffy, M. Sheldon, D. D. Armstrong, A. Wynshaw-Boris, J. Herz, G. D'Arcangelo et G. D. Clark. 2003. «Interaction of reelin signaling and *Lis1* in brain development». *Nat Genet*, vol. 35, no 3, p. 270-276.
- Association Canadienne pour la santé mentale. 2012. «<http://www.acsm.qc.ca>». consulté en mai 2012.
- Atanasiu, R., M. J. Dumoulin, R. Chahine, M. A. Mateescu et R. Nadeau. 1995. «Antiarrhythmic effects of ceruloplasmin during reperfusion in the ischemic isolated rat heart». *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 73, no 9, p. 1253-1261.
- Atanasiu, R., L. Gouin, M. A. Mateescu, R. Cardinal et R. Nadeau. 1996. «Class III antiarrhythmic effects of ceruloplasmin on rat heart». *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 74, no 6, p. 652-656.
- Atanasiu, R. L., D. Stea, M. A. Mateescu, C. Vergely, F. Dalloz, F. Briot, V. Maupoil, R. Nadeau et L. Rochette. 1998. «Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties». *Mol Cell Biochem*, vol. 189, no 1-2, p. 127-135.
- Attieh, Z. K., C. K. Mukhopadhyay, V. Seshadri, N. A. Tripoulas et P. L. Fox. 1999. «Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism». *J Biol Chem*, vol. 274, no 2, p. 1116-1123.

- Ballif, B. A., L. Arnaud, W. T. Arthur, D. Guris, A. Imamoto et J. A. Cooper. 2004. «Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons». *Curr Biol*, vol. 14, no 7, p. 606-610.
- Bar, I., C. Lambert de Rouvroit et A. M. Goffinet. 2000. «The evolution of cortical development. An hypothesis based on the role of the Reelin signaling pathway». *Trends Neurosci*, vol. 23, no 12, p. 633-638.
- Baranov, V. S., V. N. Gorbunova, L. V. Puchkova, A. L. Shvartsman et V. M. Mikhailov. 1986. «[Characteristics of ceruloplasmin synthesis in mammalian embryogenesis. 2. The yolk sac as the site of the primary expression of the ceruloplasmin gene in rats]». *Ontogenez*, vol. 17, no 1, p. 37-46.
- Barnes, G., et E. Frieden. 1984. «Ceruloplasmin receptors of erythrocytes». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 125, no 1, p. 157-162.
- Baron, P., O. Gomez-Marin, C. Casas, J. Heil, N. Will, R. Condie, B. Burke, J. S. Najarian et D. E. Sutherland. 1991. «Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury». *J Surg Res*, vol. 51, no 1, p. 60-65.
- Barrass, B. C., D. B. Coult, P. Rich et K. J. Tutt. 1974. «Substrate specificity of caeruloplasmin. Phenylalkylamine substrates». *Biochem Pharmacol*, vol. 23, no 1, p. 47-56.
- Bates, G.W., E.F. Workman et M.R. Schlabach. 1973. «Does transferrin exhibit ferroxidase activity?». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 50, p. 84-90.
- Bell Canada, Campagne "Cause pour la cause". 2012. [www.cause.bell.ca](http://www.cause.bell.ca). consulté en février 2012.
- Bellenchi, G. C., C. B. Gurniak, E. Perlas, S. Middei, M. Ammassari-Teule et W. Witke. 2007. «N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex». *Genes Dev*, vol. 21, no 18, p. 2347-2357.
- Benhamla, T., Y. D. Tirouche, A. Abaoub-Germain et F. Theodore. 2007. «[The onset of psychiatric disorders and Wilson's disease]». *Encephale*, vol. 33, no 6, p. 924-932.
- Benitez-Diaz, P., L. Miranda-Contreras, R. V. Mendoza-Briceno, Z. Pena-Contreras et E. Palacios-Pru. 2003. «Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex». *Dev Neurosci*, vol. 25, no 5, p. 366-374.
- Benito, E., et A. Barco. 2010. «CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models». *Trends Neurosci*, vol. 33, no 5, p. 230-240.

- Berg, D., et H. Hochstrasser. 2006. «Iron metabolism in Parkinsonian syndromes». *Mov Disord*, vol. 21, no 9, p. 1299-1310.
- Berner, J., T. Ringstedt, E. Brodin, T. Hokfelt, H. Lagercrantz et R. Wickstrom. 2008. «Prenatal exposure to nicotine affects substance p and preprotachykinin-A mRNA levels in newborn rat». *Pediatr Res*, vol. 64, no 6, p. 621-624.
- Bernier, B., I. Bar, G. D'Arcangelo, T. Curran et A. M. Goffinet. 2000. «Reelin mRNA expression during embryonic brain development in the chick». *J Comp Neurol*, vol. 422, no 3, p. 448-463.
- Berthon, G. 1993. «Is copper pro- or anti-inflammatory? A reconciling view and a novel approach for the use of copper in the control of inflammation». *Agents Actions*, vol. 39, no 3-4, p. 210-217.
- Bianchini, A., G. Musci et L. Calabrese. 1999. «Inhibition of endothelial nitric-oxide synthase by ceruloplasmin». *J Biol Chem*, vol. 274, no 29, p. 20265-20270.
- Bingle, C. D., R. E. Fleming et J. D. Gitlin. 1993. «Interaction of CCAAT/enhancer-binding protein alpha and beta with the rat caeruloplasmin gene promoter». *Biochem J*, vol. 294 ( Pt 2), p. 473-479.
- Bogoch, Y., et M. Linial. 2008. «Coordinated expression of cytoskeleton regulating genes in the accelerated neurite outgrowth of P19 embryonic carcinoma cells». *Exp Cell Res*, vol. 314, no 4, p. 677-690.
- Boivin, S., M. Aouffen, A. Fournier et M. A. Mateescu. 2001. «Molecular characterization of human and bovine ceruloplasmin using MALDI-TOF mass spectrometry». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 288, no 4, p. 1006-1010.
- Boll, M. C., M. Alcaraz-Zubeldia, S. Montes et C. Rios. 2008. «Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases». *Neurochem Res*, vol. 33, no 9, p. 1717-1723.
- Borland, G., B. O. Smith et S. J. Yarwood. 2009. «EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP». *Br J Pharmacol*, vol. 158, no 1, p. 70-86.
- Borrell, V., et O. Marin. 2006. «Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling». *Nat Neurosci*, vol. 9, no 10, p. 1284-1293.
- Botella-Lopez, A., F. Burgaya, R. Gavin, M. S. Garcia-Ayllon, E. Gomez-Tortosa, J. Pena-Casanova, J. M. Urena, J. A. Del Rio, R. Blesa, E. Soriano et J. Saez-Valero. 2006. «Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no 14, p. 5573-5578.

- Botia, B., M. Basille, A. Allais, E. Raoult, A. Falluel-Morel, L. Galas, V. Jolivel, O. Wurtz, H. Komuro, A. Fournier, H. Vaudry, D. Burel, B. J. Gonzalez et D. Vaudry. 2007. «Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex». *Peptides*, vol. 28, no 9, p. 1746-1752.
- Bowman, B.H. 1993. «Hepatic plasma proteins: mechanisms of fonction and regulation». p. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA:142-150.
- Bullmann, T., M. Holzer, H. Mori et T. Arendt. 2009. «Pattern of tau isoforms expression during development in vivo». *Int J Dev Neurosci*, vol. 27, no 6, p. 591-597.
- Cadet, N., et J. Paquin. 2000. «Conversion and storage of somatostatin are established before response to secretagogue stimuli in P19 neurons». *Brain Res Dev Brain Res*, vol. 120, no 2, p. 211-221.
- Calabrese, L., E. Capuozzo, A. Galtieri et E. Bellocco. 1983. «Sheep ceruloplasmin: isolation and characterization». *Mol Cell Biochem*, vol. 51, no 2, p. 129-132.
- Calabrese, L., et M. Carbonaro. 1986. «An e.p.r. study of the non-equivalence of the copper sites of caeruloplasmin». *Biochem J*, vol. 238, no 1, p. 291-295.
- Calabrese, L., M. A. Mateescu, M. Carbonaro et B. Mondovi. 1988. «Reexamination of spectroscopic properties of ceruloplasmin freshly isolated with a novel very rapid single-step procedure». *Biochem Int*, vol. 16, no 2, p. 199-208.
- Cameron, D. B., L. Galas, Y. Jiang, E. Raoult, D. Vaudry et H. Komuro. 2007. «Cerebellar cortical-layer-specific control of neuronal migration by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide». *Neuroscience*, vol. 146, no 2, p. 697-712.
- Cameron, D. B., E. Raoult, L. Galas, Y. Jiang, K. Lee, T. Hu, D. Vaudry et H. Komuro. 2009. «Role of PACAP in controlling granule cell migration». *Cerebellum*, vol. 8, no 4, p. 433-440.
- Capo, C. R., M. Arciello, R. Squitti, E. Cassetta, P. M. Rossini, L. Calabrese et L. Rossi. 2008. «Features of ceruloplasmin in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients». *Biometals*, vol. 21, no 3, p. 367-372.
- Cargnello, M., et P. P. Roux. 2011. «Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases». *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 75, no 1, p. 50-83.
- Cha, M. K., et I. H. Kim. 1999. «Ceruloplasmin has a distinct active site for the catalyzing glutathione-dependent reduction of alkyl hydroperoxide». *Biochemistry*, vol. 38, no 37, p. 12104-12110.

- Chahine, R., M. A. Mateescu, S. Roger, N. Yamaguchi, J. de Champlain et R. Nadeau. 1991. «Protective effects of ceruloplasmin against electrolysis-induced oxygen free radicals in rat heart». *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 69, no 10, p. 1459-1464.
- Chai, X., E. Forster, S. Zhao, H. H. Bock et M. Frotscher. 2009a. «Reelin acts as a stop signal for radially migrating neurons by inducing phosphorylation of n-cofilin at the leading edge». *Commun Integr Biol*, vol. 2, no 4, p. 375-377.
- , 2009b. «Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3». *J Neurosci*, vol. 29, no 1, p. 288-299.
- Chang, E. A., Z. Beyhan, M. S. Yoo, K. Siripattarapivat, T. Ko, K. J. Lookingland, B. V. Madhukar et J. B. Cibelli. 2010. «Increased cellular turnover in response to fluoxetine in neuronal precursors derived from human embryonic stem cells». *Int J Dev Biol*, vol. 54, no 4, p. 707-715.
- Chang, Y. Z., Z. M. Qian, K. Wang, L. Zhu, X. D. Yang, J. R. Du, L. Jiang, K. P. Ho, Q. Wang et Y. Ke. 2005. «Effects of development and iron status on ceruloplasmin expression in rat brain». *J Cell Physiol*, vol. 204, no 2, p. 623-631.
- Chauhan, A., et V. Chauhan. 2006. «Oxidative stress in autism». *Pathophysiology*, vol. 13, no 3, p. 171-181.
- Cheun, J. E., et H. H. Yeh. 1991. «Differentiation of a stem cell line toward a neuronal phenotype». *Int J Dev Neurosci*, vol. 9, no 4, p. 391-404.
- Chiu, F. C., L. Feng, S. O. Chan, C. Padin et J. H. Federoff. 1995. «Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells». *Brain Res Mol Brain Res*, vol. 30, no 1, p. 77-86.
- Chizhikov, V. V., et K. J. Millen. 2004. «Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS». *Nat Rev Neurosci*, vol. 5, no 10, p. 808-812.
- Connemann, B. J., C. Schonfeldt-Lecuona, H. J. Maxon, W. Kratzer et J. Kassubek. 2010. «[The role of ceruloplasmin in the differential diagnosis of neuropsychiatric disorders]». *Fortschr Neurol Psychiatr*, vol. 78, no 10, p. 582-589.
- Costa, E., J. Davis, D. R. Grayson, A. Guidotti, G. D. Pappas et C. Pesold. 2001. «Dendritic spine hypoplasticity and downregulation of reelin and GABAergic tone in schizophrenia vulnerability». *Neurobiol Dis*, vol. 8, no 5, p. 723-742.
- Cousins, R. J. 1985. «Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin». *Physiol Rev*, vol. 65, no 2, p. 238-309.

- Crippa, M. P. 2007. «Urokinase-type plasminogen activator». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 39, no 4, p. 690-694.
- Curzon, G. 1961. «Some properties of coupled iron-caeruloplasmin oxidation system». *Biochem J*, vol. 79, p. 656-663.
- Curzon, G., et S. O'Reilly. 1960. «A coupled iron-caeruloplasmin oxidation system». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 2, p. 284-286.
- D'Arcangelo, G., R. Homayouni, L. Keshvara, D. S. Rice, M. Sheldon et T. Curran. 1999. «Reelin is a ligand for lipoprotein receptors». *Neuron*, vol. 24, no 2, p. 471-479.
- D'Arcangelo, G., G. G. Miao, S. C. Chen, H. D. Soares, J. I. Morgan et T. Curran. 1995. «A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler». *Nature*, vol. 374, no 6524, p. 719-723.
- Dancis, A., D. G. Roman, G. J. Anderson, A. G. Hinnebusch et R. D. Klausner. 1992. «Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, no 9, p. 3869-3873.
- David, S., et B. Patel. 2000. «Ceruloplasmin: structure and function of an essential ferroxidase». *Adv Struct Biol*, vol. 6, p. 221-237.
- Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano et P. Cohen. 2000. «Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors». *Biochem J*, vol. 351, no Pt 1, p. 95-105.
- Dawson, H. N., A. Ferreira, M. V. Eyster, N. Ghoshal, L. I. Binder et M. P. Vitek. 2001. «Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice». *J Cell Sci*, vol. 114, no Pt 6, p. 1179-1187.
- de Bergeyck, V., K. Nakajima, C. Lambert de Rouvroit, B. Naerhuyzen, A. M. Goffinet, T. Miyata, M. Ogawa et K. Mikoshiba. 1997. «A truncated Reelin protein is produced but not secreted in the 'Orleans' reeler mutation (Reln[rl-Orl])». *Brain Res Mol Brain Res*, vol. 50, no 1-2, p. 85-90.
- De Domenico, I., D. M. Ward, M. C. di Patti, S. Y. Jeong, S. David, G. Musci et J. Kaplan. 2007. «Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin». *Embo J*, vol. 26, no 12, p. 2823-2831.
- de Graaf-Peters, V. B., et M. Hadders-Algra. 2006. «Ontogeny of the human central nervous system: what is happening when?». *Early Hum Dev*, vol. 82, no 4, p. 257-266.
- de Mol, N. J. 1985. «Interaction of phenothiazine drugs with human ceruloplasmin. Relation between activation of catecholamine neurotransmitter oxidation and electron



- donating ability of phenothiazine drugs». *Biochem Pharmacol*, vol. 34, no 15, p. 2605-2609.
- de Silva, D., S. Davis-Kaplan, J. Fergestad et J. Kaplan. 1997. «Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin». *J Biol Chem*, vol. 272, no 22, p. 14208-14213.
- De Silva, D. M., C. C. Askwith, D. Eide et J. Kaplan. 1995. «The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase». *J Biol Chem*, vol. 270, no 3, p. 1098-1101.
- de Silva, D. M., C. C. Askwith et J. Kaplan. 1996. «Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes». *Physiol Rev*, vol. 76, no 1, p. 31-47.
- Del Bigio, M. R., S. Hosain et M. Altumbabic. 1999. «Localization of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors in mouse forebrain during postnatal development». *Int J Dev Neurosci*, vol. 17, no 4, p. 387-399.
- Derer, P., M. Derer et A. Goffinet. 2001. «Axonal secretion of Reelin by Cajal-Retzius cells: evidence from comparison of normal and Reelin(Orl) mutant mice». *J Comp Neurol*, vol. 440, no 2, p. 136-143.
- Deutsch, S. I., R. B. Rosse et L. H. Deutsch. 2006. «Faulty regulation of tau phosphorylation by the reelin signal transduction pathway is a potential mechanism of pathogenesis and therapeutic target in Alzheimer's disease». *Eur Neuropsychopharmacol*, vol. 16, no 8, p. 547-551.
- di Patti, M. C., N. Maio, G. Rizzo, G. De Francesco, T. Persichini, M. Colasanti, F. Polticelli et G. Musci. 2009. «Dominant mutants of ceruloplasmin impair the copper loading machinery in aceruloplasminemia». *J Biol Chem*, vol. 284, no 7, p. 4545-4554.
- Doehner, J., A. Madhusudan, U. Konietzko, J. M. Fritschy et I. Knuesel. 2010. «Co-localization of Reelin and proteolytic AbetaPP fragments in hippocampal plaques in aged wild-type mice». *J Alzheimers Dis*, vol. 19, no 4, p. 1339-1357.
- Ducharme, P., D. Maltais, D. Desroches, M. A. Mateescu et J. Paquin. 2010. «Ceruloplasmin-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage». *Neuroscience*, vol. 167, no 3, p. 633-643.
- Ducharme, Philippe. 2007. *L'action neuroagréative de la céruloplasmine impliquerait une activité protéolytique*. Montréal: Université du Québec à Montréal, xi, 98 f. p.
- Dulabon, L., E. C. Olson, M. G. Taglienti, S. Eisenhuth, B. McGrath, C. A. Walsh, J. A. Kreidberg et E. S. Anton. 2000. «Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration». *Neuron*, vol. 27, no 1, p. 33-44.

- Dumoulin, M. J., R. Chahine, R. Atanasiu, R. Nadeau et M. A. Mateescu. 1996. «Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin». *Arzneimittelforschung*, vol. 46, no 9, p. 855-861.
- Dusek, P., J. Jankovic et W. Le. 2012. «Iron dysregulation in movement disorders». *Neurobiol Dis*, vol. 46, no 1, p. 1-18.
- Eriksson, S. H., M. Thom, J. Heffernan, W. R. Lin, B. N. Harding, M. V. Squier et S. M. Sisodiya. 2001. «Persistent reelin-expressing Cajal-Retzius cells in polymicrogyria». *Brain*, vol. 124, no Pt 7, p. 1350-1361.
- Evangelopoulos, M. E., J. Weis et A. Kruttgen. 2009. «Mevastatin-induced neurite outgrowth of neuroblastoma cells via activation of EGFR». *J Neurosci Res*, vol. 87, no 9, p. 2138-2144.
- Evans, G. W. 1973. «Copper homeostasis in the mammalian system». *Physiol Rev*, vol. 53, no 3, p. 535-570.
- Fahrion, J. K., Y. Komuro, Y. Li, N. Ohno, Y. Littner, E. Raoult, L. Galas, D. Vaudry et H. Komuro. 2012. «Rescue of neuronal migration deficits in a mouse model of fetal Minamata disease by increasing neuronal  $Ca^{2+}$  spike frequency». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 109, no 13, p. 5057-5062.
- Fatemi, S. H. 2005a. «Reelin glycoprotein in autism and schizophrenia». *Int Rev Neurobiol*, vol. 71, p. 179-187.
- , 2005b. «Reelin glycoprotein: structure, biology and roles in health and disease». *Mol Psychiatry*, vol. 10, no 3, p. 251-257.
- Fatemi, S. H., J. L. Kroll et J. M. Stry. 2001. «Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders». *Neuroreport*, vol. 12, no 15, p. 3209-3215.
- Fatemi, S. H., A. V. Snow, J. M. Stry, M. Araghi-Niknam, T. J. Reutiman, S. Lee, A. I. Brooks et D. A. Pearce. 2005. «Reelin signaling is impaired in autism». *Biol Psychiatry*, vol. 57, no 7, p. 777-787.
- Fatemi, S. H., J. M. Stry et E. A. Egan. 2002. «Reduced blood levels of reelin as a vulnerability factor in pathophysiology of autistic disorder». *Cell Mol Neurobiol*, vol. 22, no 2, p. 139-152.
- Finley, M. F., N. Kulkarni et J. E. Huettner. 1996. «Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells». *J Neurosci*, vol. 16, no 3, p. 1056-1065.
- Fix, James D. 2006. *Neuro-anatomie*, 3e éd. Bruxelles: De Boeck, vii, 204 p.

- Fleming, R. E., I. P. Whitman et J. D. Gitlin. 1991. «Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxia». *Am J Physiol*, vol. 260, no 2 Pt 1, p. L68-74.
- Floris, G., R. Medda, A. Padiglia et G. Musci. 2000. «The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach». *Biochem Pharmacol*, vol. 60, no 12, p. 1735-1741.
- Forster, E., H. H. Bock, J. Herz, X. Chai, M. Frotscher et S. Zhao. 2010. «Emerging topics in Reelin function». *Eur J Neurosci*, vol. 31, no 9, p. 1511-1518.
- Forster, E., Y. Jossin, S. Zhao, X. Chai, M. Frotscher et A. M. Goffinet. 2006. «Recent progress in understanding the role of Reelin in radial neuronal migration, with specific emphasis on the dentate gyrus». *Eur J Neurosci*, vol. 23, no 4, p. 901-909.
- Fortna, R. R., H. A. Watson et S. E. Nyquist. 1999. «Glycosyl phosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is expressed by rat Sertoli cells and is concentrated in detergent-insoluble membrane fractions». *Biol Reprod*, vol. 61, no 4, p. 1042-1049.
- Fox, P. L. 2003. «The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship». *Biometals*, vol. 16, no 1, p. 9-40.
- Fox, P. L., C. Mukhopadhyay et E. Ehrenwald. 1995. «Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin». *Life Sci*, vol. 56, no 21, p. 1749-1758.
- Frieden, E. 1980. «Caeruloplasmin: a multi-functional metalloprotein of vertebrate plasma». *Ciba Found Symp*, vol. 79, p. 93-124.
- , 1981. «Copper Proteins». *Dans Metal ions in biological system*, vol. vol 13, Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA: 117-40
- , 1986. «Perspectives on copper biochemistry». *Clin Physiol Biochem*, vol. 4, no 1, p. 11-19.
- Frieden, E., et H. S. Hsieh. 1976. «Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity». *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, vol. 44, p. 187-236.
- Frotscher, M. 1998. «Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers». *Curr Opin Neurobiol*, vol. 8, no 5, p. 570-575.
- Frotscher, M., X. Chai, H. H. Bock, C. A. Haas, E. Forster et S. Zhao. 2009. «Role of Reelin in the development and maintenance of cortical lamination». *J Neural Transm*, vol. 116, no 11, p. 1451-1455.

- Frustaci, A., M. Neri, A. Cesario, J. B. Adams, E. Domenici, B. Dalla Bernardina et S. Bonassi. 2012. «Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses». *Free Radic Biol Med*.
- Furie, M. B., B. L. Naprstek et S. C. Silverstein. 1987. «Migration of neutrophils across monolayers of cultured microvascular endothelial cells. An in vitro model of leucocyte extravasation». *J Cell Sci*, vol. 88 ( Pt 2), p. 161-175.
- Fuster-Matanzo, A., E. G. de Barreda, H. N. Dawson, M. P. Vitek, J. Avila et F. Hernandez. 2009. «Function of tau protein in adult newborn neurons». *FEBS Lett*, vol. 583, no 18, p. 3063-3068.
- Galdston, M., V. Levytska, M. S. Schwartz et B. Magnusson. 1984. «Ceruloplasmin. Increased serum concentration and impaired antioxidant activity in cigarette smokers, and ability to prevent suppression of elastase inhibitory capacity of alpha 1-proteinase inhibitor». *Am Rev Respir Dis*, vol. 129, no 2, p. 258-263.
- Gambling, L., C. Kennedy et H. J. McArdle. 2011. «Iron and copper in fetal development». *Semin Cell Dev Biol*, vol. 22, no 6, p. 637-644.
- Ganaraja, B., P. Pavithran et S. Ghosh. 2004. «Effect of estrogen on plasma ceruloplasmin level in rats exposed to acute stress». *Indian J Med Sci*, vol. 58, no 4, p. 150-154.
- Gerits, N., S. Kostenko, A. Shiryaev, M. Johannessen et U. Moens. 2008. «Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility». *Cell Signal*, vol. 20, no 9, p. 1592-1607.
- Gitlin, D., et C. A. Janeway. 1960. «Turnover of the copper and protein moieties of ceruloplasmin». *Nature*, vol. 185, p. 693.
- Gitlin, J. D. 1998. «Aceruloplasminemia». *Pediatr Res*, vol. 44, no 3, p. 271-276.
- Gleeson, J. G. 2001. «Neuronal migration disorders». *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, vol. 7, no 3, p. 167-171.
- Goffinet, A. M., I. Bar, B. Bernier, C. Trujillo, A. Raynaud et G. Meyer. 1999. «Reelin expression during embryonic brain development in lacertilian lizards». *J Comp Neurol*, vol. 414, no 4, p. 533-550.
- Goldstein, I. M., H. B. Kaplan, H. S. Edelson et G. Weissmann. 1979. «A new function for ceruloplasmin as an acute-phase reactant in inflammation: a scavenger of superoxide anion radicals». *Trans Assoc Am Physicians*, vol. 92, p. 360-369.
- , 1982. «Ceruloplasmin: an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals». *Ann N Y Acad Sci*, vol. 389, p. 368-379.

- Gorbunova, V. N., et V. S. Baranov. 1984. «[Characteristics of ceruloplasmin synthesis in embryogenesis and in the early postnatal period of laboratory white rats]». *Ontogenez*, vol. 15, no 1, p. 63-72.
- Gressens, P. 2005. «Neuronal migration disorders». *J Child Neurol*, vol. 20, no 12, p. 969-971.
- Grilli, M., G. Ferrari Toninelli, D. Uberti, P. Spano et M. Memo. 2003. «Alzheimer's disease linking neurodegeneration with neurodevelopment». *Funct Neurol*, vol. 18, no 3, p. 145-148.
- Guidotti, A., J. Auta, J. M. Davis, V. Di-Giorgi-Gerevini, Y. Dwivedi, D. R. Grayson, F. Impagnatiello, G. Pandey, C. Pesold, R. Sharma, D. Uzunov et E. Costa. 2000. «Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study». *Arch Gen Psychiatry*, vol. 57, no 11, p. 1061-1069.
- Gutteridge, J. M. 1983. «Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron- and copper-dependent oxygen radical formation». *FEBS Lett*, vol. 157, no 1, p. 37-40.
- . 1985. «Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities». *Chem Biol Interact*, vol. 56, no 1, p. 113-120.
- Haas, C. A., O. Dudeck, M. Kirsch, C. Huszka, G. Kann, S. Pollak, J. Zentner et M. Frotscher. 2002. «Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy». *J Neurosci*, vol. 22, no 14, p. 5797-5802.
- Haase, A., et G. Bicker. 2003. «Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo». *Development*, vol. 130, no 17, p. 3977-3987.
- Hack, I., M. Bancila, K. Loulier, P. Carroll et H. Cremer. 2002. «Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis». *Nat Neurosci*, vol. 5, no 10, p. 939-945.
- Hack, I., S. Hellwig, D. Junghans, B. Brunne, H. H. Bock, S. Zhao et M. Frotscher. 2007. «Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons». *Development*, vol. 134, no 21, p. 3883-3891.
- Haines, Duane E., et Michael P. Schenk. 2012. *Neuroanatomy : an atlas of structures, sections, and systems*, 8th. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, xi, 332 p.
- Harmar, A. J., J. Fahrenkrug, I. Gozes, M. Laburthe, V. May, J. R. Pisegna, D. Vaudry, H. Vaudry, J. A. Waschek et S. I. Said. 2012. «Pharmacology and functions of receptors

- for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1». *Br J Pharmacol*, vol. 166, no 1, p. 4-17.
- Harris, Z. L., A. P. Durley, T. K. Man et J. D. Gitlin. 1999. «Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no 19, p. 10812-10817.
- Harris, Z. L., Y. Takahashi, H. Miyajima, M. Serizawa, R. T. MacGillivray et J. D. Gitlin. 1995. «Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, no 7, p. 2539-2543.
- Hatzia Apostolou, M., P. Katsoris et E. Papadimitriou. 2003. «Different inhibitors of plasmin differentially affect angiostatin production and angiogenesis». *Eur J Pharmacol*, vol. 460, no 1, p. 1-8.
- Healy, J., et K. Tipton. 2007. «Ceruloplasmin and what it might do». *J Neural Transm*, vol. 114, no 6, p. 777-781.
- Hellman, N. E., et J. D. Gitlin. 2002. «Ceruloplasmin metabolism and function». *Annu Rev Nutr*, vol. 22, p. 439-458.
- Herz, J., et Y. Chen. 2006. «Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity». *Nat Rev Neurosci*, vol. 7, no 11, p. 850-859.
- Hibi, T., et M. Hattori. 2009. «The N-terminal fragment of Reelin is generated after endocytosis and released through the pathway regulated by Rab11». *FEBS Lett*, vol. 583, no 8, p. 1299-1303.
- Hiesberger, T., M. Trommsdorff, B. W. Howell, A. Goffinet, M. C. Mumby, J. A. Cooper et J. Herz. 1999. «Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation». *Neuron*, vol. 24, no 2, p. 481-489.
- Hilton, M., D. C. Spenser, P. Ross, A. Ramsey et H. J. McArdle. 1995. «Characterisation of the copper uptake mechanism and isolation of the ceruloplasmin receptor/copper transporter in human placental vesicles». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1245, no 2, p. 153-160.
- Hirobe, T. 2009. «Ferrous ferric chloride stimulates the skin cell function and hair growth in mice». *Biol Pharm Bull*, vol. 32, no 8, p. 1347-1353.
- Hirotsune, S., T. Takahara, N. Sasaki, K. Hirose, A. Yoshiki, T. Ohashi, M. Kusakabe, Y. Murakami, M. Muramatsu, S. Watanabe et al. 1995. «The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons». *Nat Genet*, vol. 10, no 1, p. 77-83.



- Ho-Tin-Noe, B., H. Enslen, L. Doeuvre, J. M. Corsi, H. R. Lijnen et E. Angles-Cano. 2009. «Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival». *Mol Cell Neurosci*, vol. 42, no 4, p. 288-295.
- Holmberg, C. G. 1944. «On the presence of a laccase-like enzyme in serum and its relation to the copper in serum». *Acta Physiol Scand*, vol. 8, p. 227-229.
- Holmberg, C. G., et C.B. Laurell. 1948. «Investigations in serum copper II. Isolation of the copper containing protein, and description of its properties.». *Acta Chem Scand*, vol. 2, p. 550-556.
- Hong, S. E., Y. Y. Shugart, D. T. Huang, S. A. Shahwan, P. E. Grant, J. O. Hourihane, N. D. Martin et C. A. Walsh. 2000. «Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations». *Nat Genet*, vol. 26, no 1, p. 93-96.
- Houslay, M. D., M. Sullivan et G. B. Bolger. 1998. «The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions». *Adv Pharmacol*, vol. 44, p. 225-342.
- Howe, A. K. 2004. «Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1692, no 2-3, p. 159-174.
- Howell, B. W., F. B. Gertler et J. A. Cooper. 1997. «Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development». *Embo J*, vol. 16, no 1, p. 121-132.
- Howell, B. W., T. M. Herrick et J. A. Cooper. 1999. «Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning». *Genes Dev*, vol. 13, no 6, p. 643-648.
- Huang, C., K. Jacobson et M. D. Schaller. 2004. «MAP kinases and cell migration». *J Cell Sci*, vol. 117, no Pt 20, p. 4619-4628.
- Ikeda, Y., et T. Terashima. 1997. «Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse». *Dev Dyn*, vol. 210, no 2, p. 157-172.
- Impagnatiello, F., A. R. Guidotti, C. Pesold, Y. Dwivedi, H. Caruncho, M. G. Pisu, D. P. Uzunov, N. R. Smalheiser, J. M. Davis, G. N. Pandey, G. D. Pappas, P. Tueting, R. P. Sharma et E. Costa. 1998. «A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no 26, p. 15718-15723.
- Inoue, K., T. Akaike, Y. Miyamoto, T. Okamoto, T. Sawa, M. Otagiri, S. Suzuki, T. Yoshimura et H. Maeda. 1999. «Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin.

- Implication for cytoprotective mechanism in vivo». *J Biol Chem*, vol. 274, no 38, p. 27069-27075.
- Jackson, G. E., L. Mkhonta-Gama, A. Voye et M. Kelly. 2000. «Design of copper-based anti-inflammatory drugs». *J Inorg Biochem*, vol. 79, no 1-4, p. 147-152.
- Jaeger, J. L., N. Shimizu et J. D. Gitlin. 1991. «Tissue-specific ceruloplasmin gene expression in the mammary gland». *Biochem J*, vol. 280 ( Pt 3), p. 671-677.
- Jeannotte, R., J. Paquin, C. Petit-Turcotte et R. Day. 1997. «Convertase PC2 and the neuroendocrine polypeptide 7B2 are co-induced and processed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells». *DNA Cell Biol*, vol. 16, no 10, p. 1175-1187.
- Jeong, S. Y., et S. David. 2003. «Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system». *J Biol Chem*, vol. 278, no 29, p. 27144-27148.
- , 2006. «Age-related changes in iron homeostasis and cell death in the cerebellum of ceruloplasmin-deficient mice». *J Neurosci*, vol. 26, no 38, p. 9810-9819.
- Jones-Villeneuve, E. M., M. W. McBurney, K. A. Rogers et V. I. Kalnins. 1982. «Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells». *J Cell Biol*, vol. 94, no 2, p. 253-262.
- Jossin, Y., I. Bar, N. Ignatova, F. Tissir, C. L. De Rouvroit et A. M. Goffinet. 2003. «The reelin signaling pathway: some recent developments». *Cereb Cortex*, vol. 13, no 6, p. 627-633.
- Jossin, Y., L. Gui et A. M. Goffinet. 2007. «Processing of Reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons». *J Neurosci*, vol. 27, no 16, p. 4243-4252.
- Jossin, Y., N. Ignatova, T. Hiesberger, J. Herz, C. Lambert de Rouvroit et A. M. Goffinet. 2004. «The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development». *J Neurosci*, vol. 24, no 2, p. 514-521.
- Juan, S. H., et S. D. Aust. 1998. «Studies on the interaction between ferritin and ceruloplasmin». *Arch Biochem Biophys*, vol. 355, no 1, p. 56-62.
- Kamolsilp, M. 2005. «Menkes syndrome: a case report». *J Med Assoc Thai*, vol. 88 Suppl 3, p. S290-294.
- Kaplan, J., et T. V. O'Halloran. 1996. «Iron metabolism in eukaryotes: Mars and Venus at it again». *Science*, vol. 271, no 5255, p. 1510-1512.

- Kataoka, M., et M. Tavassoli. 1984. «Ceruloplasmin receptors in liver cell suspensions are limited to the endothelium». *Exp Cell Res*, vol. 155, no 1, p. 232-240.
- , 1985. «Identification of ceruloplasmin receptors on the surface of human blood monocytes, granulocytes, and lymphocytes». *Exp Hematol*, vol. 13, no 8, p. 806-810.
- Kato, T., R. Ohtani-Kaneko, K. Ono, N. Okado et T. Shiga. 2005. «Developmental regulation of activated ERK expression in the spinal cord and dorsal root ganglion of the chick embryo». *Neurosci Res*, vol. 52, no 1, p. 11-19.
- Ke, Y., K. Ho, J. Du, L. Zhu, Y. Xu, Q. Wang, C. Y. Wang, L. Li, X. Ge, Y. Chang et Z. M. Qian. 2006. «Role of soluble ceruloplasmin in iron uptake by midbrain and hippocampus neurons». *J Cell Biochem*, vol. 98, no 4, p. 912-919.
- Kerjan, G., et J. G. Gleeson. 2007. «A missed exit: Reelin sets in motion Dab1 polyubiquitination to put the break on neuronal migration». *Genes Dev*, vol. 21, no 22, p. 2850-2854.
- Khrestchatisky, M., J. Jourquin, C. Ogier, G. Charton, A. Bernard, E. Tremblay et S. Rivera. 2003. «[Matrix metalloproteinases and their inhibitors, modulators of neuro-immune interactions and of pathophysiological processes in the nervous system]». *J Soc Biol*, vol. 197, no 2, p. 133-144.
- Kim, H. M., T. Qu, V. Kriho, P. Lacor, N. Smalheiser, G. D. Pappas, A. Guidotti, E. Costa et K. Sugaya. 2002. «Reelin function in neural stem cell biology». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 99, no 6, p. 4020-4025.
- Kim, I. G., et S. Y. Park. 1998. «Requirement of intact human ceruloplasmin for the glutathione-linked peroxidase activity». *FEBS Lett*, vol. 437, no 3, p. 293-296.
- Klomp, L. W., Z. S. Farhangrazi, L. L. Dugan et J. D. Gitlin. 1996. «Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system». *J Clin Invest*, vol. 98, no 1, p. 207-215.
- Klomp, L. W., et J. D. Gitlin. 1996. «Expression of the ceruloplasmin gene in the human retina and brain: implications for a pathogenic model in aceruloplasminemia». *Hum Mol Genet*, vol. 5, no 12, p. 1989-1996.
- Knuesel, I. 2010. «Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases». *Prog Neurobiol*, vol. 91, no 4, p. 257-274.
- Kobayashi, H., M. Suzuki, N. Kanayama et T. Terao. 2004. «A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation». *Clin Exp Metastasis*, vol. 21, no 2, p. 159-166.

- Koch, S., V. Strasser, C. Hauser, D. Fasching, C. Brandes, T. M. Bajari, W. J. Schneider et J. Nimpf. 2002. «A secreted soluble form of ApoE receptor 2 acts as a dominant-negative receptor and inhibits Reelin signaling». *Embo J*, vol. 21, no 22, p. 5996-6004.
- Kocherhans, S., A. Madhusudan, J. Doeber, K. S. Breu, R. M. Nitsch, J. M. Fritschy et I. Knuesel. 2010. «Reduced Reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice». *J Neurosci*, vol. 30, no 27, p. 9228-9240.
- Kodama, H., C. Fujisawa et W. Bhadrprasit. 2012. «Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment». *Curr Drug Metab*, vol. 13, no 3, p. 237-250.
- Kohno, S., T. Kohno, Y. Nakano, K. Suzuki, M. Ishii, H. Tagami, A. Baba et M. Hattori. 2009a. «Mechanism and significance of specific proteolytic cleavage of Reelin». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 380, no 1, p. 93-97.
- Kohno, T., et M. Hattori. 2010. «Re-evaluation of protease activity of reelin». *Biol Pharm Bull*, vol. 33, no 6, p. 1047-1049.
- Kohno, T., Y. Nakano, N. Kitoh, H. Yagi, K. Kato, A. Baba et M. Hattori. 2009b. «C-terminal region-dependent change of antibody-binding to the Eighth Reelin repeat reflects the signaling activity of Reelin». *J Neurosci Res*, vol. 87, no 14, p. 3043-3053.
- Kono, S. 2012. «Aceruloplasminemia». *Curr Drug Targets*.
- Korzh, S., A. Emelyanov et V. Korzh. 2001. «Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish». *Mech Dev*, vol. 103, no 1-2, p. 137-139.
- Kostenko, S., A. Shiryaev, G. Dumitriu, N. Gerits et U. Moens. 2011. «Cross-talk between protein kinase A and the MAPK-activated protein kinases RSK1 and MK5». *J Recept Signal Transduct Res*, vol. 31, no 1, p. 1-9.
- Krens, S. F., H. P. Spaink et B. E. Snaar-Jagalska. 2006. «Functions of the MAPK family in vertebrate-development». *FEBS Lett*, vol. 580, no 21, p. 4984-4990.
- Krook, H., A. Hagberg, Z. Song, U. Landegren, L. Wennberg et O. Korsgren. 2002. «A distinct Th1 immune response precedes the described Th2 response in islet xenograft rejection». *Diabetes*, vol. 51, no 1, p. 79-86.
- Kruger, M. T., S. Zhao, X. Chai, B. Brunne, E. Bouche, H. H. Bock et M. Frotscher. 2010. «Role for Reelin-induced cofilin phosphorylation in the assembly of sympathetic

- preganglionic neurons in the murine intermediolateral column». *Eur J Neurosci*, vol. 32, no 10, p. 1611-1617.
- Kubis, N., et M. Catala. 2005. «[Where have the neuronal stem cells of the subependymal zone gone in human beings?].» *Morphologie*, vol. 89, no 284, p. 49-54.
- Kunapuli, S. P., H. Singh, P. Singh et A. Kumar. 1987. «Ceruloplasmin gene expression in human cancer cells». *Life Sci*, vol. 40, no 23, p. 2225-2228.
- Lacor, P. N., D. R. Grayson, J. Auta, I. Sugaya, E. Costa et A. Guidotti. 2000. «Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no 7, p. 3556-3561.
- Lambert de Rouvroit, C., V. de Bergeyck, C. Cortvrindt, I. Bar, Y. Eeckhout et A. M. Goffinet. 1999. «Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase». *Exp Neurol*, vol. 156, no 1, p. 214-217.
- Lambert de Rouvroit, C., et A. M. Goffinet. 2001. «Neuronal migration». *Mech Dev*, vol. 105, no 1-2, p. 47-56.
- Lavdas, A. A., M. Grigoriou, V. Pachnis et J. G. Parnavelas. 1999. «The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex». *J Neurosci*, vol. 19, no 18, p. 7881-7888.
- Le cerveau à tous les niveaux. 2002. «<http://lecerveau.mcgill.ca>». consulté en septembre 2011.
- Le Verche, V., A. M. Kaindl, C. Verney, Z. Csaba, S. Peineau, P. Olivier, H. Adle-Biasette, C. Leterrier, T. Vitalis, J. Renaud, B. Dargent, P. Gressens et P. Dournaud. 2009. «The somatostatin 2A receptor is enriched in migrating neurons during rat and human brain development and stimulates migration and axonal outgrowth». *PLoS One*, vol. 4, no 5, p. e5509.
- Lee, S. Y., H. J. Kim, W. J. Lee, S. H. Joo, S. J. Jeon, J. W. Kim, H. S. Kim, S. H. Han, J. Lee, S. H. Park, J. H. Cheong, W. K. Kim, K. H. Ko et C. Y. Shin. 2008. «Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue plasminogen activator activity by the cyclic-AMP system in lipopolysaccharide-stimulated rat primary astrocytes». *Neurochem Res*, vol. 33, no 11, p. 2324-2334.
- Levenson, J. M., S. Qiu et E. J. Weeber. 2008. «The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1779, no 8, p. 422-431.
- Li, M., J. Liu et C. Zhang. 2011. «Evolutionary history of the vertebrate mitogen activated protein kinases family». *PLoS One*, vol. 6, no 10, p. e26999.



- Linder, M. C., R. R. Bryant, S. Lim, L. E. Scott et J. E. Moor. 1979. «Ceruloplasmin elevation and synthesis in rats with transplantable tumors». *Enzyme*, vol. 24, no 2, p. 85-95.
- Linder, M. C., L. Wooten, P. Cerveza, S. Cotton, R. Shulze et N. Lomeli. 1998. «Copper transport». *Am J Clin Nutr*, vol. 67, no 5 Suppl, p. 965S-971S.
- Lindley, P.F., G. Card, I. Zaitzeva, V. Zatischev, B. Reinhammar, E. Selin-lindgren et K. Yoshida. 1997. «An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity». *J Biol Inorg Chem*, vol. 2, p. 454-463.
- Lockhart, P. J., et J. F. Mercer. 1999. «Cloning and expression analysis of the sheep ceruloplasmin cDNA». *Gene*, vol. 236, no 2, p. 251-257.
- Lossi, L., et G. Gambino. 2008. «Apoptosis of the cerebellar neurons». *Histol Histopathol*, vol. 23, no 3, p. 367-380.
- Lossi, L., et A. Merighi. 2003. «In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS». *Prog Neurobiol*, vol. 69, no 5, p. 287-312.
- Louro, M. O., J. A. Cocho, A. Mera et J. C. Tutor. 2000. «Immunochemical and enzymatic study of ceruloplasmin in rheumatoid arthritis». *J Trace Elem Med Biol*, vol. 14, no 3, p. 174-178.
- Lovstad, R. A. 1981. «The protective action of ceruloplasmin on Fe<sup>2+</sup> stimulated lysis of rat erythrocytes». *Int J Biochem*, vol. 13, no 2, p. 221-224.
- Lowndes, S. A., et A. L. Harris. 2004. «Copper chelation as an antiangiogenic therapy». *Oncol Res*, vol. 14, no 11-12, p. 529-539.
- Lukasiuk, K., G. M. Wilczynski et L. Kaczmarek. 2011. «Extracellular proteases in epilepsy». *Epilepsy Res*, vol. 96, no 3, p. 191-206.
- Machonkin, T. E., H. H. Zhang, B. Hedman, K. O. Hodgson et E. I. Solomon. 1998. «Spectroscopic and magnetic studies of human ceruloplasmin: identification of a redox-inactive reduced Type 1 copper site». *Biochemistry*, vol. 37, no 26, p. 9570-9578.
- MacKenzie, A., et J. Quinn. 2002. «A yeast artificial chromosome containing the human preprotachykinin-A gene expresses substance P in mice and drives appropriate marker-gene expression during early brain embryogenesis». *Mol Cell Neurosci*, vol. 19, no 1, p. 72-87.
- Mackiewicz, A., M. K. Ganapathi, D. Schultz et I. Kushner. 1987. «Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins». *J Exp Med*, vol. 166, no 1, p. 253-258.



- MacPherson, P. A., S. Jones, P. A. Pawson, K. C. Marshall et M. W. McBurney. 1997. «P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons in vitro». *Neuroscience*, vol. 80, no 2, p. 487-499.
- MacPherson, P. A., et M.W. Mc Burney. 1995. «P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation». *Dans Methods: a companion to methods in Enzymology*, vol. 7, p. 487-499.
- Magdaleno, S., L. Keshvara et T. Curran. 2002. «Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of Reelin in reeler mice». *Neuron*, vol. 33, no 4, p. 573-586.
- Magnuson, D. S., D. J. Morassutti, W. A. Staines, M. W. McBurney et K. C. Marshall. 1995. «In vivo electrophysiological maturation of neurons derived from a multipotent precursor (embryonal carcinoma) cell line». *Brain Res Dev Brain Res*, vol. 84, no 1, p. 130-141.
- Maltais, D., D. Desroches, M. Aouffen, M. A. Mateescu, R. Wang et J. Paquin. 2003. «The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: a potential modulator of nervous system organization». *Neuroscience*, vol. 121, no 1, p. 73-82.
- Mani, K., F. Cheng, B. Havsmark, S. David et L. A. Fransson. 2004. «Involvement of glycosylphosphatidylinositol-linked ceruloplasmin in the copper/zinc-nitric oxide-dependent degradation of glypican-1 heparan sulfate in rat C6 glioma cells». *J Biol Chem*, vol. 279, no 13, p. 12918-12923.
- Mann, T., et D. Keilin. 1938. «Haemocuprein and hepatocuprein, copper protein compounds of blood and liver in mammals». *Proc Roy Soc London B*, vol. 126, p. 303-315.
- Marklund, S. L. 1986. «Ceruloplasmin, extracellular-superoxide dismutase, and scavenging of superoxide anion radicals». *J Free Radic Biol Med*, vol. 2, no 4, p. 255-260.
- Marques, L., A. Auriac, A. Willemetz, J. Banha, B. Silva, F. Canonne-Hergaux et L. Costa. 2012. «Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface». *Blood Cells Mol Dis*, vol. 48, no 2, p. 110-120.
- Mateescu, M. A., R. Chahine, S. Roger, R. Atanasiu, N. Yamaguchi, G. Lalumiere et R. Nadeau. 1995. «Protection of myocardial tissue against deleterious effects of oxygen free radicals by ceruloplasmin». *Arzneimittelforschung*, vol. 45, no 4, p. 476-480.
- Mateescu, M. A., W. T. Wang, O. Befani, M. J. Dumoulin et B. Mondovi. 1999. «Simultaneous chromatographic separation of ceruloplasmin and serum amine oxidase». In *in: Analytical and Separation Methods of Biomacromolecules* H. Y. Aboul-Enein, p. 431-444. New York: (Aboul-Enein HY, ed) Marcel Dekker Inc.

- Maurin, J. C., M. L. Couble, M. Didier-Bazes, C. Brisson, H. Magloire et F. Bleicher. 2004. «Expression and localization of reelin in human odontoblasts». *Matrix Biol*, vol. 23, no 5, p. 277-285.
- Mazumder, B., et P. L. Fox. 1999. «Delayed translational silencing of ceruloplasmin transcript in gamma interferon-activated U937 monocytic cells: role of the 3' untranslated region». *Mol Cell Biol*, vol. 19, no 10, p. 6898-6905.
- Mazumder, B., C. K. Mukhopadhyay, A. Prok, M. K. Cathcart et P. L. Fox. 1997. «Induction of ceruloplasmin synthesis by IFN-gamma in human monocytic cells». *J Immunol*, vol. 159, no 4, p. 1938-1944.
- McAuslan, B. R., et W. Reilly. 1980. «Endothelial cell phagokinesis in response to specific metal ions». *Exp Cell Res*, vol. 130, no 1, p. 147-157.
- McAuslan, B. R., W. G. Reilly, G. N. Hannan et G. A. Gole. 1983. «Angiogenic factors and their assay: activity of formyl methionyl leucyl phenylalanine, adenosine diphosphate, heparin, copper, and bovine endothelium stimulating factor». *Microvasc Res*, vol. 26, no 3, p. 323-338.
- McBurney, M. W. 1993. «P19 embryonal carcinoma cells». *Int J Dev Biol*, vol. 37, no 1, p. 135-140.
- McBurney, M. W., E. M. Jones-Villeneuve, M. K. Edwards et P. J. Anderson. 1982. «Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line». *Nature*, vol. 299, no 5879, p. 165-167.
- McBurney, M. W., K. R. Reuhl, A. I. Ally, S. Nasipuri, J. C. Bell et J. Craig. 1988. «Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture». *J Neurosci*, vol. 8, no 3, p. 1063-1073.
- McNeill, A., M. Pandolfo, J. Kuhn, H. Shang et H. Miyajima. 2008. «The neurological presentation of ceruloplasmin gene mutations». *Eur Neurol*, vol. 60, no 4, p. 200-205.
- Meyer, G., C. G. Perez-Garcia, H. Abraham et D. Caput. 2002. «Expression of p73 and Reelin in the developing human cortex». *J Neurosci*, vol. 22, no 12, p. 4973-4986.
- Meyer, G., J. M. Soria, J. R. Martinez-Galan, B. Martin-Clemente et A. Fairen. 1998. «Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex». *J Comp Neurol*, vol. 397, no 4, p. 493-518.
- Meyer, L. A., A. P. Durley, J. R. Prohaska et Z. L. Harris. 2001. «Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice». *J Biol Chem*, vol. 276, no 39, p. 36857-36861.

- Mikhailenko, I., W. Considine, K. M. Argraves, D. Loukinov, B. T. Hyman et D. K. Strickland. 1999. «Functional domains of the very low density lipoprotein receptor: molecular analysis of ligand binding and acid-dependent ligand dissociation mechanisms». *J Cell Sci*, vol. 112 (Pt 19), p. 3269-3281.
- Miranda-Contreras, L., P. Benitez-Diaz, Z. Pena-Contreras, R. V. Mendoza-Briceno et E. Palacios-Pru. 2002. «Levels of amino acid neurotransmitters during neurogenesis and in histotypic cultures of mouse spinal cord». *Dev Neurosci*, vol. 24, no 1, p. 59-70.
- Miranda-Contreras, L., P. R. Benitez-Diaz, R. V. Mendoza-Briceno, M. C. Delgado-Saez et E. L. Palacios-Pru. 1999. «Levels of amino acid neurotransmitters during mouse cerebellar neurogenesis and in histotypic cerebellar cultures». *Dev Neurosci*, vol. 21, no 2, p. 147-158.
- Miranda-Contreras, L., L. M. Ramirez-Martens, P. R. Benitez-Diaz, Z. C. Pena-Contreras, R. V. Mendoza-Briceno et E. L. Palacios-Pru. 2000. «Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures». *Int J Dev Neurosci*, vol. 18, no 1, p. 83-91.
- Mittal, B., et S. David. 1994a. «A monoclonal antibody that recognizes an adhesion molecule expressed by certain cells of neuroectodermal and mesenchymal origin». *Mol Cell Neurosci*, vol. 5, no 1, p. 63-77.
- , 1994b. «The role of an astrocyte surface molecule in neuronal migration in the developing rat cerebellum». *Mol Cell Neurosci*, vol. 5, no 1, p. 78-86.
- Mittal, B., M. M. Doroudchi, S. Y. Jeong, B. N. Patel et S. David. 2003. «Expression of a membrane-bound form of the ferroxidase ceruloplasmin by leptomeningeal cells». *Glia*, vol. 41, no 4, p. 337-346.
- Miyajima, H., Y. Nishimura, K. Mizoguchi, M. Sakamoto, T. Shimizu et N. Honda. 1987. «Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration». *Neurology*, vol. 37, no 5, p. 761-767.
- Molina, G., A. Vogt, A. Bakan, W. Dai, P. Queiroz de Oliveira, W. Znosko, T. E. Smithgall, I. Bahar, J. S. Lazo, B. W. Day et M. Tsang. 2009. «Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages». *Nat Chem Biol*, vol. 5, no 9, p. 680-687.
- Molinari, F., V. Meskanaite, A. Munnich, P. Sonderegger et L. Colleaux. 2003. «Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system». *Hum Mol Genet*, vol. 12 Spec No 2, p. R195-200.
- Mollgard, K., K. M. Dziegielewska, N. R. Saunders, H. Zakut et H. Soreq. 1988. «Synthesis and localization of plasma proteins in the developing human brain. Integrity of the

- fetal blood-brain barrier to endogenous proteins of hepatic origin». *Dev Biol*, vol. 128, no 1, p. 207-221.
- Morandat, S., M. Bortolato et B. Roux. 2003. «Role of GPI-anchored enzyme in liposome detergent-resistance». *J Membr Biol*, vol. 191, no 3, p. 215-221.
- Morassutti, D. J., W. A. Staines, D. S. Magnuson, K. C. Marshall et M. W. McBurney. 1994. «Murine embryonal carcinoma-derived neurons survive and mature following transplantation into adult rat striatum». *Neuroscience*, vol. 58, no 4, p. 753-763.
- Morell, A. G., R. A. Irvine, I. Sternlieb, I. H. Scheinberg et G. Ashwell. 1968. «Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo». *J Biol Chem*, vol. 243, no 1, p. 155-159.
- Morokuma, Y., M. Yamazaki, T. Maeda, I. Yoshino, M. Ishizuka, T. Tanaka, Y. Ito et R. Tsuboi. 2008. «Hair growth stimulatory effect by a combination of 5-aminolevulinic acid and iron ion». *Int J Dermatol*, vol. 47, no 12, p. 1298-1303.
- Mostad, E. J., et J. R. Prohaska. 2011. «Glycosylphosphatidylinositol-linked ceruloplasmin is expressed in multiple rodent organs and is lower following dietary copper deficiency». *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 236, no 3, p. 298-308.
- Muhle, R., S. V. Trentacoste et I. Rapin. 2004. «The genetics of autism». *Pediatrics*, vol. 113, no 5, p. e472-486.
- Mukhopadhyay, C. K., Z. K. Attieh et P. L. Fox. 1998. «Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake». *Science*, vol. 279, no 5351, p. 714-717.
- Mukhopadhyay, C. K., B. Mazumder et P. L. Fox. 2000. «Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency». *J Biol Chem*, vol. 275, no 28, p. 21048-21054.
- Mukhopadhyay, C. K., B. Mazumder, P. F. Lindley et P. L. Fox. 1997. «Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no 21, p. 11546-11551.
- Nadarajah, B., et J. G. Parnavelas. 2002. «Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex». *Nat Rev Neurosci*, vol. 3, no 6, p. 423-432.
- Nadella, K. S., M. Saji, N. K. Jacob, E. Pavel, M. D. Ringel et L. S. Kirschner. 2009. «Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of Limk1». *EMBO Rep*, vol. 10, no 6, p. 599-605.
- Nakano, Y., T. Kohno, T. Hibi, S. Kohno, A. Baba, K. Mikoshiba, K. Nakajima et M. Hattori. 2007. «The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not

- necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling». *J Biol Chem*, vol. 282, no 28, p. 20544-20552.
- Nasulewicz, A., A. Mazur et A. Opolski. 2004. «Role of copper in tumour angiogenesis--clinical implications». *J Trace Elem Med Biol*, vol. 18, no 1, p. 1-8.
- Nielsen, K. B., A. Sondergaard, M. G. Johansen, K. Schauser, M. Vejlsted, A. L. Nielsen, A. L. Jorgensen et I. E. Holm. 2010. «Reelin expression during embryonic development of the pig brain». *BMC Neurosci*, vol. 11, p. 75.
- Nishikawa, S., S. Goto, K. Yamada, T. Hamasaki et Y. Ushio. 2003. «Lack of Reelin causes malpositioning of nigral dopaminergic neurons: evidence from comparison of normal and *Reln*(rl) mutant mice». *J Comp Neurol*, vol. 461, no 2, p. 166-173.
- Ogawa, M., T. Miyata, K. Nakajima, K. Yagyu, M. Seike, K. Ikenaka, H. Yamamoto et K. Mikoshiba. 1995. «The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons». *Neuron*, vol. 14, no 5, p. 899-912.
- Olivares, M., et R. Uauy. 1996. «Copper as an essential nutrient». *Am J Clin Nutr*, vol. 63, no 5, p. 791S-796S.
- Omoto, E., et M. Tavassoli. 1990. «Purification and partial characterization of ceruloplasmin receptors from rat liver endothelium». *Arch Biochem Biophys*, vol. 282, no 1, p. 34-38.
- Orena, S. J., C. A. Goode et M. C. Linder. 1986. «Binding and uptake of copper from ceruloplasmin». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 139, no 2, p. 822-829.
- Osaki, S., D. A. Johnson et E. Frieden. 1966. «The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum». *J Biol Chem*, vol. 241, no 12, p. 2746-2751.
- Panteri, R., A. Paiardini et F. Keller. 2006. «A 3D model of Reelin subrepeat regions predicts Reelin binding to carbohydrates». *Brain Res*, vol. 1116, no 1, p. 222-230.
- Paquin, J., B. A. Danalache, M. Jankowski, S. M. McCann et J. Gutkowska. 2002. «Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 99, no 14, p. 9550-9555.
- Paradis, M., J. Gagne, M. A. Mateescu et J. Paquin. 2010. «The effects of nitric oxide-oxidase and putative glutathione-peroxidase activities of ceruloplasmin on the viability of cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide». *Free Radic Biol Med*, vol. 49, no 12, p. 2019-2027.

- Parellada, M., C. Moreno, K. Mac-Dowell, J. C. Leza, M. Giraldez, C. Bailon, C. Castro, P. Miranda-Azpiaz, D. Fraguas et C. Arango. 2012. «Plasma antioxidant capacity is reduced in Asperger syndrome». *J Psychiatr Res*, vol. 46, no 3, p. 394-401.
- Park, Y. S., K. Suzuki, N. Taniguchi et J. M. Gutteridge. 1999. «Glutathione peroxidase-like activity of ceruloplasmin as an important lung antioxidant». *FEBS Lett*, vol. 458, no 2, p. 133-136.
- Parnas, D., et M. Linial. 1995. «Cholinergic properties of neurons differentiated from an embryonal carcinoma cell-line (P19)». *Int J Dev Neurosci*, vol. 13, no 7, p. 767-781.
- , 1997a. «Acceleration of neuronal maturation of P19 cells by increasing culture density». *Brain Res Dev Brain Res*, vol. 101, no 1-2, p. 115-124.
- , 1997b. «Culture density regulates both the cholinergic phenotype and the expression of the CNTF receptor in P19 neurons». *J Mol Neurosci*, vol. 8, no 2, p. 115-130.
- Patel, B. N., et S. David. 1997. «A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes». *J Biol Chem*, vol. 272, no 32, p. 20185-20190.
- Patel, B. N., R. J. Dunn et S. David. 2000. «Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain». *J Biol Chem*, vol. 275, no 6, p. 4305-4310.
- Patel, B. N., R. J. Dunn, S. Y. Jeong, Q. Zhu, J. P. Julien et S. David. 2002. «Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury». *J Neurosci*, vol. 22, no 15, p. 6578-6586.
- Pemberton, S., P. Lindley, V. Zaitsev, G. Card, E. G. Tuddenham et G. Kemball-Cook. 1997. «A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin». *Blood*, vol. 89, no 7, p. 2413-2421.
- Percival, S. S., et E. D. Harris. 1991. «Regulation of Cu,Zn superoxide dismutase with copper. Ceruloplasmin maintains levels of functional enzyme activity during differentiation of K562 cells». *Biochem J*, vol. 274 ( Pt 1), p. 153-158.
- Persico, A. M., L. D'Agruma, N. Maiorano, A. Totaro, R. Militerni, C. Bravaccio, T. H. Wassink, C. Schneider, R. Melmed, S. Trillo, F. Montecchi, M. Palermo, T. Pascucci, S. Puglisi-Allegra, K. L. Reichelt, M. Conciatori, R. Marino, C. C. Quattrocchi, A. Baldi, L. Zelante, P. Gasparini et F. Keller. 2001. «Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder». *Mol Psychiatry*, vol. 6, no 2, p. 150-159.
- Petrak, J., et D. Vyorat. 2005. «Hephaestin--a ferroxidase of cellular iron export». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 37, no 6, p. 1173-1178.



- Poirier, S., G. Mayer, S. Benjannet, E. Bergeron, J. Marcinkiewicz, N. Nassoury, H. Mayer, J. Nimpf, A. Prat et N. G. Seidah. 2008. «The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2». *J Biol Chem*, vol. 283, no 4, p. 2363-2372.
- Poirier, S., A. Prat, E. Marcinkiewicz, J. Paquin, B. P. Chitramuthu, D. Baranowski, B. Cadieux, H. P. Bennett et N. G. Seidah. 2006. «Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system». *J Neurochem*, vol. 98, no 3, p. 838-850.
- Polsek, D., T. Jagatic, M. Cepanec, P. R. Hof et G. Simic. 2011. «Recent Developments in Neuropathology of Autism Spectrum Disorders». *Transl Neurosci*, vol. 2, no 3, p. 256-264.
- Puchkova, L. V., T. D. Aleinikova, E. T. Zakharova, L. A. Konopistseva, N. V. Tsymbalenko et V. S. Gaitskoki. 1994. «[Regulation of biosynthesis of molecular forms of ceruloplasmin in rat ontogenesis]». *Biokhimiia*, vol. 59, no 9, p. 1304-1311.
- Puchkova, L. V., L. K. Sasina, T. D. Aleinikova, E. T. Zakharova et V. S. Gaitskhoki. 1997. «Reconstitution of the intercellular transfer pathway of the peptide moiety of ceruloplasmin in mammals». *Biochemistry (Mosc)*, vol. 62, no 7, p. 697-703.
- Puchkova, L. V., I. A. Verbina, V. V. Denezhkina, M. M. Shavlovskii, V. S. Gaitskoki et S. A. Neifakh. 1990. «[Various properties of the ceruloplasmin receptor, isolated from human erythrocyte membranes]». *Biokhimiia*, vol. 55, no 12, p. 2182-2189.
- Pullikuth, A. K., et A. D. Catling. 2007. «Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective». *Cell Signal*, vol. 19, no 8, p. 1621-1632.
- Qian, Z. M., Y. Z. Chang, L. Zhu, L. Yang, J. R. Du, K. P. Ho, Q. Wang, L. Z. Li, C. Y. Wang, X. Ge, N. L. Jing, L. Li et Y. Ke. 2007. «Development and iron-dependent expression of hephaestin in different brain regions of rats». *J Cell Biochem*, vol. 102, no 5, p. 1225-1233.
- Qian, Z. M., et Y. Ke. 2001. «Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism». *Brain Res Brain Res Rev*, vol. 35, no 3, p. 287-294.
- Quattrocchi, C. C., C. Huang, S. Niu, M. Sheldon, D. Benhayon, J. Cartwright, Jr., D. R. Mosier, F. Keller et G. D'Arcangelo. 2003. «Reelin promotes peripheral synapse elimination and maturation». *Science*, vol. 301, no 5633, p. 649-653.
- Quattrocchi, C. C., F. Wannenes, A. M. Persico, S. A. Ciafre, G. D'Arcangelo, M. G. Farace et F. Keller. 2002. «Reelin is a serine protease of the extracellular matrix». *J Biol Chem*, vol. 277, no 1, p. 303-309.

- Raju, K. S., G. Alessandri, M. Ziche et P. M. Gullino. 1982. «Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis». *J Natl Cancer Inst*, vol. 69, no 5, p. 1183-1188.
- Rakic, P. 2006. «A century of progress in corticoneurogenesis: from silver impregnation to genetic engineering». *Cereb Cortex*, vol. 16 Suppl 1, p. i3-17.
- Rathore, K. I., B. J. Kerr, A. Redensek, R. Lopez-Vales, S. Y. Jeong, P. Ponka et S. David. 2008. «Ceruloplasmin protects injured spinal cord from iron-mediated oxidative damage». *J Neurosci*, vol. 28, no 48, p. 12736-12747.
- Reynolds, J. N., A. Prasad, L. L. Gillespie et G. D. Paterno. 1996. «Developmental expression of functional GABAA receptors containing the gamma 2 subunit in neurons derived from embryonal carcinoma (P19) cells». *Brain Res Mol Brain Res*, vol. 35, no 1-2, p. 11-18.
- Reynolds, J. N., P. J. Ryan, A. Prasad et G. D. Paterno. 1994. «Neurons derived from embryonal carcinoma (P19) cells express multiple GABAA receptor subunits and fully functional GABAA receptors». *Neurosci Lett*, vol. 165, no 1-2, p. 129-132.
- Rho, J. M., et T. W. Storey. 2001. «Molecular ontogeny of major neurotransmitter receptor systems in the mammalian central nervous system: norepinephrine, dopamine, serotonin, acetylcholine, and glycine». *J Child Neurol*, vol. 16, no 4, p. 271-280; discussion 281.
- Rice, D., et S. Barone, Jr. 2000. «Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models». *Environ Health Perspect*, vol. 108 Suppl 3, p. 511-533.
- Rius, R. A., T. Chikuma et Y. P. Loh. 1991. «Prenatal processing of pro-opiomelanocortin in the brain and pituitary of mouse embryos». *Brain Res Dev Brain Res*, vol. 60, no 2, p. 179-185.
- Rivera, S., J. Jourquin, C. Ogier, A. Bernard, G. Charton, E. Tremblay et M. Khrestchatisky. 2004. «[The MMP/TIMP system in the nervous system]». *Med Sci (Paris)*, vol. 20, no 1, p. 55-60.
- Roeser, H. P., G. R. Lee, S. Nacht et G. E. Cartwright. 1970. «The role of ceruloplasmin in iron metabolism». *J Clin Invest*, vol. 49, no 12, p. 2408-2417.
- Rowitch, D. H., et A. R. Kriegstein. 2010. «Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification». *Nature*, vol. 468, no 7321, p. 214-222.
- Rudnicki, M.A., et M.W. Mc Burney. 1987. «Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines». *Dans Teratocarcinomas and embryonic Stem cells: A practical approach*, vol. (E.J. Robertson). Oxford, IRL Press: 19-49.

- Ryden, L., et I. Bjork. 1976. «Reinvestigation of some physicochemical and chemical properties of human ceruloplasmin (ferroxidase)». *Biochemistry*, vol. 15, no 16, p. 3411-3417.
- Saenko, E. L., V. V. Basevich et A. I. Iaropolov. 1988. «[Characteristics of ceruloplasmin interaction with a specific receptor of human erythrocytes]». *Biokhimiia*, vol. 53, no 2, p. 317-321.
- Saenko, E. L., O. V. Skorobogat'ko et A. I. Yaropolov. 1990. «Protective action of blood ceruloplasmin obtained from normal individuals on red blood cells compared with that from patients with Wilson's disease». *Biomed Sci*, vol. 1, no 5, p. 453-459.
- Salzer, J. L., L. Lovejoy, M. C. Linder et C. Rosen. 1998. «Ran-2, a glial lineage marker, is a GPI-anchored form of ceruloplasmin». *J Neurosci Res*, vol. 54, no 2, p. 147-157.
- Sanada, K., A. Gupta et L. H. Tsai. 2004. «Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis». *Neuron*, vol. 42, no 2, p. 197-211.
- Sanchez, S., C. Jimenez, A. C. Carrera, J. Diaz-Nido, J. Avila et F. Wandosell. 2004. «A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation». *Neurochem Int*, vol. 44, no 4, p. 231-242.
- Santé Canada. 2012. «[www.hc-sc.gc.ca](http://www.hc-sc.gc.ca)». consulté en mai 2012.
- Sapir, T., M. Frotscher, T. Levy, E. M. Mandelkow et O. Reiner. 2012. «Tau's role in the developing brain: implications for intellectual disability». *Hum Mol Genet*, vol. 21, no 8, p. 1681-1692.
- Sarkar, B. 1999. «Treatment of Wilson and menkes diseases». *Chem Rev*, vol. 99, no 9, p. 2535-2544.
- Sasina, L. K., L. V. Puchkova et V. S. Gaitskhoki. 1998. «Study of intracellular localization and traffic of newly synthesized ceruloplasmin receptor in cultured human fibroblasts». *Biochemistry (Mosc)*, vol. 63, no 10, p. 1172-1177.
- Sasina, L. K., N. V. Tsymbalenko, N. A. Platonova, L. V. Puchkova, O. V. Voronina, N. E. Gyulikhhandanova et V. S. Gaitskhoki. 2000. «Isolation and partial characterization of cDNA clone of human ceruloplasmin receptor». *Bull Exp Biol Med*, vol. 129, no 5, p. 491-495.
- Scheinberg, I. H., et D. Gitlin. 1952. «Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease)». *Science*, vol. 116, no 3018, p. 484-485.

- Schiffmann, S. N., B. Bernier et A. M. Goffinet. 1997. «Reelin mRNA expression during mouse brain development». *Eur J Neurosci*, vol. 9, no 5, p. 1055-1071.
- Schmid, R. S., R. Jo, S. Shelton, J. A. Kreidberg et E. S. Anton. 2005. «Reelin, integrin and DAB1 interactions during embryonic cerebral cortical development». *Cereb Cortex*, vol. 15, no 10, p. 1632-1636.
- Schroeder, R. J., S. N. Ahmed, Y. Zhu, E. London et D. A. Brown. 1998. «Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains». *J Biol Chem*, vol. 273, no 2, p. 1150-1157.
- Schroeder, R., E. London et D. Brown. 1994. «Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, no 25, p. 12130-12134.
- Schulz, A., K. J. Geissler, S. Kumar, G. Leichsenring, H. Morrison et S. L. Baader. 2010. «Merlin inhibits neurite outgrowth in the CNS». *J Neurosci*, vol. 30, no 30, p. 10177-10186.
- Scotti, A. L., et G. Herrmann. 2002. «Reelin immunoreactivity in dissociated cultures of the postnatal hippocampus». *Brain Res*, vol. 924, no 2, p. 209-218.
- Seeds, N. W., M. E. Basham et S. P. Haffke. 1999. «Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no 24, p. 14118-14123.
- Seo, J. K. 2006. «[Wilson disease: an update.]». *Korean J Hepatol*, vol. 12, no 3, p. 333-363.
- Shabb, J. B. 2001. «Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase». *Chem Rev*, vol. 101, no 8, p. 2381-2411.
- Shakiba, Y., K. Mansouri et A. Mostafaie. 2007. «Anti-angiogenic effect of soybean kunitz trypsin inhibitor on human umbilical vein endothelial cells». *Fitoterapia*, vol. 78, no 7-8, p. 587-589.
- Sharom, F. J., et G. Radeva. 2004. «GPI-anchored protein cleavage in the regulation of transmembrane signals». *Subcell Biochem*, vol. 37, p. 285-315.
- Sheldon, M., D. S. Rice, G. D'Arcangelo, H. Yoneshima, K. Nakajima, K. Mikoshiba, B. W. Howell, J. A. Cooper, D. Goldowitz et T. Curran. 1997. «Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice». *Nature*, vol. 389, no 6652, p. 730-733.

- Shepherd, G.M. 1994. «Neurobiology». vol. Oxford University Press, Inc. New York, NY, USA: 192-225.
- Shi, X., C. Stoj, A. Romeo, D. J. Kosman et Z. Zhu. 2003. «Fre1p Cu<sup>2+</sup> reduction and Fet3p Cu<sup>1+</sup> oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*». *J Biol Chem*, vol. 278, no 50, p. 50309-50315.
- Shiva, S., X. Wang, L. A. Ringwood, X. Xu, S. Yuditskaya, V. Annavajjhala, H. Miyajima, N. Hogg, Z. L. Harris et M. T. Gladwin. 2006. «Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis». *Nat Chem Biol*, vol. 2, no 9, p. 486-493.
- Sinagra, M., D. Verrier, D. Frankova, K. M. Korwek, J. Blahos, E. J. Weeber, O. J. Manzoni et P. Chavis. 2005. «Reelin, very-low-density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor 2 control somatic NMDA receptor composition during hippocampal maturation in vitro». *J Neurosci*, vol. 25, no 26, p. 6127-6136.
- Slack, J. M. W. 2004. *Biologie du développement*. Coll. «En bref...». Bruxelles: De Boeck, 482 p.
- Sparrow, N., M. E. Manetti, M. Bott, T. Fabianac, A. Petrilli, M. L. Bates, M. B. Bunge, S. Lambert et C. Fernandez-Valle. 2012. «The actin-severing protein cofilin is downstream of neuregulin signaling and is essential for Schwann cell myelination». *J Neurosci*, vol. 32, no 15, p. 5284-5297.
- Squitti, R., C. C. Quattrocchi, G. D. Forno, P. Antuono, D. R. Wekstein, C. R. Capo, C. Salustri et P. M. Rossini. 2007. «Ceruloplasmin (2-D PAGE) Pattern and Copper Content in Serum and Brain of Alzheimer Disease Patients». *Biomark Insights*, vol. 1, p. 205-213.
- Squitti, R., C. C. Quattrocchi, C. Salustri et P. M. Rossini. 2008. «Ceruloplasmin fragmentation is implicated in 'free' copper deregulation of Alzheimer's disease». *Prion*, vol. 2, no 1, p. 23-27.
- Staines, W. A., D. J. Morassutti, K. R. Reuhl, A. I. Ally et M. W. McBurney. 1994. «Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells have varied morphologies and neurotransmitters». *Neuroscience*, vol. 58, no 4, p. 735-751.
- Stanfield, B. B., et W. M. Cowan. 1979. «The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice». *J Comp Neurol*, vol. 185, no 3, p. 423-459.
- Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner et A. Dancis. 1996. «A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast». *Science*, vol. 271, no 5255, p. 1552-1557.

- Stern, R. V., et E. Frieden. 1990. «Detection of rat ceruloplasmin receptors using fluorescence microscopy and microdensitometry». *Anal Biochem*, vol. 190, no 1, p. 48-56.
- , 1993. «Partial purification of the rat erythrocyte ceruloplasmin receptor monitored by an electrophoresis mobility shift assay». *Anal Biochem*, vol. 212, no 1, p. 221-228.
- Stevens, M. D., R. A. DiSilvestro et E. D. Harris. 1984. «Specific receptor for ceruloplasmin in membrane fragments from aortic and heart tissues». *Biochemistry*, vol. 23, no 2, p. 261-266.
- Stocks, J., J. M. Gutteridge, R. J. Sharp et T. L. Dormandy. 1974. «The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relation to serum proteins and alpha-tocopherol». *Clin Sci Mol Med*, vol. 47, no 3, p. 223-233.
- Stoj, C., et D. J. Kosman. 2003. «Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function». *FEBS Lett*, vol. 554, no 3, p. 422-426.
- Sunderman, F. W., Jr., et S. Nomoto. 1970. «Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity». *Clin Chem*, vol. 16, no 11, p. 903-910.
- Szeto, H. H. 2003. «Dynorphin and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during fetal development». *Life Sci*, vol. 73, no 6, p. 749-758.
- Takahashi, N., T. L. Ortel et F. W. Putnam. 1984. «Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 81, no 2, p. 390-394.
- Tavassoli, M., T. Kishimoto et M. Kataoka. 1986. «Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin». *J Cell Biol*, vol. 102, no 4, p. 1298-1303.
- Tegenge, M. A., F. Roloff et G. Bicker. 2011. «Rapid differentiation of human embryonal carcinoma stem cells (NT2) into neurons for neurite outgrowth analysis». *Cell Mol Neurobiol*, vol. 31, no 4, p. 635-643.
- Tejeda, H. A., T. S. Shippenberg et R. Henriksson. 2012. «The dynorphin/kappa-opioid receptor system and its role in psychiatric disorders». *Cell Mol Life Sci*, vol. 69, no 6, p. 857-896.
- Terada, K., M. L. Schilsky, N. Miura et T. Sugiyama. 1998. «ATP7B (WND) protein». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 30, no 10, p. 1063-1067.
- Texel, S. J., X. Xu et Z. L. Harris. 2008. «Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases». *Biochem Soc Trans*, vol. 36, no Pt 6, p. 1277-1281.



- Thomas, T., G. Schreiber et A. Jaworowski. 1989. «Developmental patterns of gene expression of secreted proteins in brain and choroid plexus». *Dev Biol*, vol. 134, no 1, p. 38-47.
- Tinnes, S., M. K. Schafer, A. Flubacher, G. Munzner, M. Frotscher et C. A. Haas. 2011. «Epileptiform activity interferes with proteolytic processing of Reelin required for dentate granule cell positioning». *FASEB J*, vol. 25, no 3, p. 1002-1013.
- Tissir, F., et A. M. Goffinet. 2003. «Reelin and brain development». *Nat Rev Neurosci*, vol. 4, no 6, p. 496-505.
- Tissir, F., C. Lambert de Rouvroit et A. M. Goffinet. 2002. «The role of reelin in the development and evolution of the cerebral cortex». *Braz J Med Biol Res*, vol. 35, no 12, p. 1473-1484.
- Trommsdorff, M., M. Gotthardt, T. Hiesberger, J. Shelton, W. Stockinger, J. Nimpf, R. E. Hammer, J. A. Richardson et J. Herz. 1999. «Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2». *Cell*, vol. 97, no 6, p. 689-701.
- Tsirka, S. E. 2002. «Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function». *Biochem Soc Trans*, vol. 30, no 2, p. 222-225.
- Tueting, P., E. Costa, Y. Dwivedi, A. Guidotti, F. Impagnatiello, R. Manev et C. Pesold. 1999. «The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse». *Neuroreport*, vol. 10, no 6, p. 1329-1334.
- Twining, S. S. 1984. «Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes». *Anal Biochem*, vol. 143, no 1, p. 30-34.
- Ulrich, H., et P. Majumder. 2006. «Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications». *Cell Prolif*, vol. 39, no 4, p. 281-300.
- Ungar-Waron, H., A. Gluckman, E. Spira, M. Waron et Z. Trainin. 1978. «Ceruloplasmin as a marker of neoplastic activity in rabbits bearing the VX-2 carcinoma». *Cancer Res*, vol. 38, no 5, p. 1296-1299.
- Utsunomiya-Tate, N., K. Kubo, S. Tate, M. Kainosho, E. Katayama, K. Nakajima et K. Mikoshiba. 2000. «Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 97, no 17, p. 9729-9734.
- Vachette, P., E. Dainese, V. B. Vasyliiev, P. Di Muro, M. Beltramini, D. I. Svergun, V. De Filippis et B. Salvato. 2002. «A key structural role for active site type 3 copper ions in human ceruloplasmin». *J Biol Chem*, vol. 277, no 43, p. 40823-40831.

- Van De Craen, B., P. J. Declerck et A. Gils. 2012. «The Biochemistry, Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo». *Thromb Res*.
- van der Heyden, M. A., et L. H. Defize. 2003. «Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation». *Cardiovasc Res*, vol. 58, no 2, p. 292-302.
- Van Eden, M. E., et S. D. Aust. 2000. «Intact human ceruloplasmin is required for the incorporation of iron into human ferritin». *Arch Biochem Biophys*, vol. 381, no 1, p. 119-126.
- Vanderford, D. A., P. K. Greer, J. M. Sharp, M. Chichlowski, D. C. Rouse, M. A. Selim et L. P. Hale. 2010. «Alopecia in IL-10-deficient mouse pups is c-kit-dependent and can be triggered by iron deficiency». *Exp Dermatol*, vol. 19, no 6, p. 518-526.
- Vassiliev, V., Z. L. Harris et P. Zatta. 2005. «Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases». *Brain Res Brain Res Rev*, vol. 49, no 3, p. 633-640.
- Vaudry, D., A. Falluel-Morel, S. Bourgault, M. Basille, D. Burel, O. Wurtz, A. Fournier, B. K. Chow, H. Hashimoto, L. Galas et H. Vaudry. 2009. «Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery». *Pharmacol Rev*, vol. 61, no 3, p. 283-357.
- Waggoner, D. J., T. B. Bartnikas et J. D. Gitlin. 1999. «The role of copper in neurodegenerative disease». *Neurobiol Dis*, vol. 6, no 4, p. 221-230.
- Wang, J. Z., et F. Liu. 2008. «Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons». *Prog Neurobiol*, vol. 85, no 2, p. 148-175.
- Wang, R., L. Zhang, M. A. Mateescu et R. Nadeau. 1995. «Ceruloplasmin: an endogenous depolarizing factor in neurons?». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 207, no 2, p. 599-605.
- Wang, X. T., M. J. Dumoulin, O. Befani, B. Mondovi et M. A. Mateescu. 1994. «Joint chromatographic purification of bovine serum ceruloplasmin and amineoxidase». *Prep Biochem*, vol. 24, no 3-4, p. 237-250.
- Wang, Y., V. Hodgkinson, S. Zhu, G. A. Weisman et M. J. Petris. 2011. «Advances in the understanding of mammalian copper transporters». *Adv Nutr*, vol. 2, no 2, p. 129-137.
- Wang, Y. J., R. B. Gregory et G. J. Barritt. 2000. «Regulation of F-actin and endoplasmic reticulum organization by the trimeric G-protein Gi2 in rat hepatocytes. Implication

- for the activation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow». *J Biol Chem*, vol. 275, no 29, p. 22229-22237.
- Wei, J. Y., E. D. Cohen, H. G. Genieser et C. J. Barnstable. 1998. «Substituted cGMP analogs can act as selective agonists of the rod photoreceptor cGMP-gated cation channel». *J Mol Neurosci*, vol. 10, no 1, p. 53-64.
- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe et G. L. Johnson. 1999. «Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human». *Physiol Rev*, vol. 79, no 1, p. 143-180.
- Wilson, L., et M. Maden. 2005. «The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube». *Dev Biol*, vol. 282, no 1, p. 1-13.
- Wolf, T. L., J. Kotun et J. H. Meador-Woodruff. 2006. «Plasma copper, iron, ceruloplasmin and ferroxidase activity in schizophrenia». *Schizophr Res*, vol. 86, no 1-3, p. 167-171.
- Wolpert, L. 2004. *Biologie du développement : les grands principes*. Paris: Dunod, xxii, 479 p.
- Wynshaw-Boris, A., T. Pramparo, Y. H. Youn et S. Hirotune. 2010. «Lissencephaly: mechanistic insights from animal models and potential therapeutic strategies». *Semin Cell Dev Biol*, vol. 21, no 8, p. 823-830.
- Xu, X., S. Pin, M. Gathinji, R. Fuchs et Z. L. Harris. 2004. «Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis». *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1012, p. 299-305.
- Yamaguchi, T., Y. Watanabe, M. Tanaka, M. Nakagawa et N. Yamaguchi. 2008. «cAMP-dependent regulation of spinesin/TMPRSS5 gene expression in astrocytes». *J Neurosci Res*, vol. 86, no 3, p. 610-617.
- Yamashoji, S., et G. Kajimoto. 1983. «Antioxidant effect of caeruloplasmin on microsomal lipid peroxidation». *FEBS Lett*, vol. 152, no 2, p. 168-170.
- Yang, F. M., W. E. Friedrichs, R. L. Cupples, M. J. Bonifacio, J. A. Sanford, W. A. Horton et B. H. Bowman. 1990. «Human ceruloplasmin. Tissue-specific expression of transcripts produced by alternative splicing». *J Biol Chem*, vol. 265, no 18, p. 10780-10785.
- Yang, K., F. Cao, A. M. Sheikh, M. Malik, G. Wen, H. Wei, W. Ted Brown et X. Li. 2012. «Up-regulation of Ras/Raf/ERK1/2 signaling impairs cultured neuronal cell migration, neurogenesis, synapse formation, and dendritic spine development». *Brain Struct Funct*.

- Yang, N., O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, K. Kangawa, E. Nishida et K. Mizuno. 1998. «Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization». *Nature*, vol. 393, no 6687, p. 809-812.
- Yao, M., G. Bain et D. I. Gottlieb. 1995. «Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells in defined media». *J Neurosci Res*, vol. 41, no 6, p. 792-804.
- Yao, Y., W. Li, J. Wu, U. A. Germann, M. S. Su, K. Kuida et D. M. Boucher. 2003. «Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no 22, p. 12759-12764.
- Yonekawa, M., T. Okabe, Y. Asamoto et M. Ohta. 1999. «A case of hereditary ceruloplasmin deficiency with iron deposition in the brain associated with chorea, dementia, diabetes mellitus and retinal pigmentation: administration of fresh-frozen human plasma». *Eur Neurol*, vol. 42, no 3, p. 157-162.
- Yoshida, S., et S. Shiosaka. 1999. «Plasticity-related serine proteases in the brain (review)». *Int J Mol Med*, vol. 3, no 4, p. 405-409.
- Yuahasi, K. K., M. A. Demasi, A. S. Tamajusuku, G. Lenz, M. C. Sogayar, M. Fornazari, C. Lameu, I. C. Nascimento, T. Glaser, T. T. Schwindt, P. D. Negraes et H. Ulrich. 2012. «Regulation of neurogenesis and gliogenesis of retinoic acid-induced P19 embryonal carcinoma cells by P2X2 and P2X7 receptors studied by RNA interference». *Int J Dev Neurosci*, vol. 30, no 2, p. 91-97.
- Zaitsev, V. N., I. Zaitseva, M. Papiz et P. F. Lindley. 1999. «An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma». *J Biol Inorg Chem*, vol. 4, no 5, p. 579-587.
- Zaitseva, I., V. N. Zaitsev, G. Card, K. Moshkov, B. Bax, A. Ralph et P. F. Lindley. 1996. «The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centers». *J Natl Cancer Inst*, vol. 69, p. 475-482.
- Zhang, S. C., M. Wernig, I. D. Duncan, O. Brustle et J. A. Thomson. 2001. «In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells». *Nat Biotechnol*, vol. 19, no 12, p. 1129-1133.
- Zhang, W., et R. W. Colman. 2007. «Thrombin regulates intracellular cyclic AMP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A». *Blood*, vol. 110, no 5, p. 1475-1482.
- Zhao, S., X. Chai, E. Forster et M. Frotscher. 2004. «Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells». *Development*, vol. 131, no 20, p. 5117-5125.
- Zhao, S., et M. Frotscher. 2010. «Go or stop? Divergent roles of Reelin in radial neuronal migration». *Neuroscientist*, vol. 16, no 4, p. 421-434.

Zoller, H., I. Theurl, R. O. Koch, A. T. McKie, W. Vogel et G. Weiss. 2003. «Duodenal cytochrome b and hephaestin expression in patients with iron deficiency and hemochromatosis». *Gastroenterology*, vol. 125, no 3, p. 746-754.